

Untersuchungen zum Mechanismus der Ribonuclease T₂

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Ludwig Bonacker
aus Wallau

Marburg 1968

Untersuchungen zum Mechanismus der Ribonuclease T₂

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn



vorgelegt von

Ludwig Bonacker
aus Wallau

Marburg 1968



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am 26. Juni 1968

Tag der mündlichen Prüfung am 6. Juli 1968

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Witzel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Dimroth

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	
A. Einleitung	1
B. Isolierung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1	4
I. Verfahren zur Aktivitätsbestimmung	4
II. Isolierung	5
III. Versuche zur Charakterisierung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1	7
1. Prüfung der Einheitlichkeit	7
2. Chemische und physikalische Eigenschaften der Ribonuclease T_2	13
IV. Diskussion	14
C. Basenspezifität	16
I. Untersuchungen zur Abgrenzung der Basenspezifität	16
II. Zur Synthese der dargestellten Modellester	19
III. Diskussion	21
D. Kinetische Untersuchungen	23
I. Die Katalyse durch die Ribonuclease T_2	23
II. Die Theorie der Enzymkinetik	24
III. pH - Optimum	26
IV. Untersuchungen zur Abhängigkeit der K_m - und k_{+2} -Werte vom pH-Wert und der Natur der Base	27
1. Kinetische Untersuchungen an 2',3'-Pyrimidinnucleotiden	29
2. K_m und k_{+2} in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer	30
3. Kinetische Untersuchungen an Dinucleosidphosphaten	32
4. Ermittlung von pK-Werten	36
V. Hemmung der Reaktion durch verschiedene Modifizierer	37
VI. Diskussion	39
1. Vorschlag eines Mechanismus der Ribonuclease T_2 - Reaktion	39
2. Zum Katalyseprinzip der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1	47

	Seite
E. Zusammenfassung	49
F. Experimenteller Teil	51
I. Isolierung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1	51
II. Bestimmung der Ribonucleasenaktivität	53
III. Bestimmung der Phosphatasenaktivität	55
IV. Kinetische Messungen	56
V. Allgemeine Arbeitsmethoden	58
VI. Darstellung der Substrate	59
VII. Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese nach Davis	64
VIII. Ergebnisse der kinetischen Messungen	68
G. Literaturverzeichnis	74

Verzeichnis der Abkürzungen

In den kinetischen Ableitungen werden folgende Symbole verwendet:

E	Enzym
e	Enzymkonzentration
S	Substrat
s	Substratkonzentration
P	Produkt
p	Produktkonzentration
t	Zeit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit
k_{+2} usw.	Geschwindigkeitskonstanten
K_m	Michaelis-Menten-Konstante (Briggs-Haldane-Konstante)
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes

Die Bezeichnung der nucleosidischen Produkte erfolgt nach Vorschlägen in J. Biol. Chem. (Terminology and Abbreviations)

A, G, C, U	sind die Nucleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin
Ap,Cp,Cp,Up	sind die entsprechenden 2'- und 3'-Nucleotide
UpA usw.	sind Dinucleosidphosphate mit 3'→5'-Internucleotidbindung
Up(c) usw.	sind 2',3'-cyclische Nucleotide
Pankreas-RNase	Pankreas-Ribonuclease (2.7.7.16)
RNase T_1	Ribonuclease T_1 (2.7.7.26)
RNase T_2	Ribonuclease T_2 (2.7.7.17)
DMGS	β,β -Dimethylglutarsäure

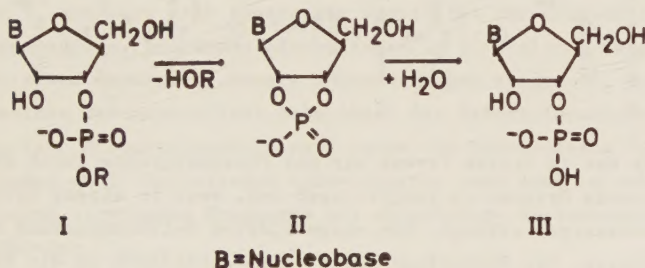


Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Enzyme, welche die 3',5'-Diesterbindungen der Ribonucleinsäure wie bei der nichtenzymatischen Hydrolyse an der 5'-Bindung lösen, sind in der Natur weit verbreitet. Sie zeigen in Molekulargewicht, Aminosäuresequenz und spezifischen Erfordernissen am Substrat große Unterschiede.

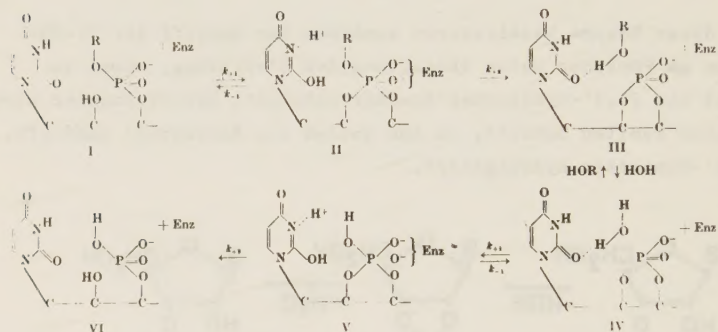
Alle diese Enzyme katalysieren zunächst den Angriff der 2'-OH-Gruppe am Phosphor unter Abspaltung der 5'-Bindung, wobei zunächst ein 2',3'-cyclischer Diester entsteht. Dieser Diester wird in einem zweiten Schritt, in dem Wasser als Nucleophil angreift, zum 3'-Monoester hydrolysiert.



Neben den Enzymen, die alle Diesterbindungen der Ribonucleinsäure angreifen, bei denen also die Nucleobase keinen direkten Einfluß auf die Geschwindigkeit ausübt, gibt es andere, die nur bei bestimmten Nucleobasen die Diesterbindung lösen.

So spaltet die Pankreas-Ribonuclease (E.C. 2.7.7.16), dessen Reaktionsweise weitgehend aufgeklärt ist^{1,2,3}, nur 3',5'-Diesterbindungen, wenn das in 3'-Stellung veresterte Nucleosid eine Pyrimidinbase trägt. Wie Gassen und Witzel¹ zeigen, gilt diese Spezifität nicht absolut. Synthetische Nucleotid-Diester, wie zum Beispiel die des 3,6-Dioxy-pyridazins, des Pyridons und auch von Purinen, wenn sie in 8-Stellung eine Hydroxygruppe tragen, werden ebenfalls hydrolysiert. Offensichtlich ist nur die Sauerstofffunktion in α -Stellung zur β -glycosidischen Bindung erforderlich. Es ist gezeigt worden^{1,2,3,4,5}, daß von ihr zunächst eine

Basenkatalyse an der 2'-OH-Gruppe durchgeführt wird, wobei sich unter Mitwirkung des Enzyms ein dianionischer Zwischenzustand mit 5-bindigem Phosphor ausbildet. Dieser zerfällt dann mit Hilfe einer Katalyse durch die konjugate Säure der Base, die entweder am 2'-Sauerstoff (Rückreaktion) oder am 5'-Sauerstoff (Produktbildung) ansetzt.



Das Enzym hat in diesem Prozeß nur die Phosphatgruppe durch zwei protonierende Gruppen zu polarisieren und, wenn in diesem Zustand die Basenkatalyse erfolgt, den ausgebildeten Zwischenzustand zu stabilisieren. Die Nucleobase greift also spezifisch in die Katalyse ein, sie hat nichts mit einer spezifischen Bindung des Substrats an das Enzym zu tun.

Weitere Ribonucleasen, die ebenfalls 3'-Nucleotide liefern, stellen Kuninaka ^{7,8} und Saruno ⁹ 1954 und 1956 in Takadiastase, einem kommerziellen Enzymextrakt *) aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae*, fest. Egami et.al. ^{9,10} und Rushizky und Sober ¹¹ gewannen nach einer Reihe von Reinigungsschritten zwei einheitliche Enzyme, welche die 3', 5'-Diester wie die Pankreas-Ribonuclease ebenfalls über die 2',3'-cyclischen Diester als Zwischenprodukte spalten.

*) Sankyo Company, Ltd, Tokyo, Japan

Sie wurden als Takadiastase-Ribonuclease T_1 (E.C. 2.7.7.26, Ribonuclease-Guaninnucleotido-2'-transferase) und als Takadiastase-Ribonuclease T_2 (E.C. 2.7.7.17, Ribonuclease-Nucleotido-2'-transferase) bezeichnet.

Die beiden Ribonucleasen sind wie die Pankreas-Ribonuclease relativ hitze- und säurestabil. Für Ribonucleinsäure als Substrat liegt bei der Ribonuclease T_1 das pH-Optimum bei pH 7.6 bei der Ribonuclease T_2 das pH-Optimum bei pH 4.5. Die Molekulargewichte betragen 11127 und 36700 ¹⁰. Für die Ribonuclease T_1 konnte Takahashi die Sequenz der 105 Aminosäuren aufklären ¹². Bei der Ribonuclease T_2 ist bisher nur die Summe der am Aufbau beteiligten Aminosäuren bekannt ¹⁰.

Während die Ribonuclease T_1 spezifisch die Phosphodiesterbindungen von 6-Hydroxy-Purinnucleotiden hydrolysiert, wurde der Ribonuclease T_2 zunächst eine bevorzugte Spezifität für Diesterbindungen zugesprochen, bei denen Adenosin das in 3'-Stellung veresterte Nucleosid darstellt. Neuere Untersuchungen zeigen ¹¹, daß keine absolute Basenspezifität beim Abbau der Ribonucleinsäure vorhanden ist. Ribonucleinsäure wird durch die Ribonuclease T_2 vollständig zu 3'-Nucleotiden hydrolysiert, wenn auch im sehr frühen Stadium vorwiegend Fragmente mit Adenylsäure am terminalen Ende auftreten ¹³.

Über den Wirkungsmechanismus dieser beiden Enzyme ist noch nichts bekannt. Der Einfluß der Nucleobasen auf die Reaktion muß ein anderer sein als bei der Pankreas-Ribonuclease. Es kann postuliert werden, daß die 2'-OH-Gruppe, wenn sie nicht durch die Nucleobase aktiviert wird, von dem Enzym aktiviert werden muß. Es kann weiterhin gefordert werden, daß bei der Ribonuclease T_1 die Aktivierung am Phosphor nicht durch den gleichzeitigen Angriff zweier protonierender Gruppen erfolgen kann, da dann auch die Pyrimidinnucleotide wie bei der Pankreas-Ribonuclease gespalten werden müßten. Bei der Ribonuclease T_2 könnte ohne weiteres eine solche Aktivierung stattfinden, wobei jetzt eine für alle 3',5'-Diester gleiche Aktivierung der 2'-OH-Gruppe die bei der Pankreas-Ribonuclease bestehenden Unterschiede aufhebt. Die folgenden Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus beschäftigen sich deshalb im wesentlichen mit diesem Enzym.

Die Ribonuclease T_2 ist im Gegensatz zur Pankreas-Ribonuclease im Handel nicht erhältlich. Es stellte sich daher zunächst die Aufgabe, sie in ausreichender Menge aus einem in Deutschland zugänglichen Material ^{*)} zu isolieren, um sie anschließend im Hinblick auf ihren Wirkungsmechanismus untersuchen zu können. Die bei der Isolierung anfallende Ribonuclease T_1 wurde ebenfalls als einheitliches Enzym erhalten. An ihm sind von Pongs ^{14,15} entsprechende Arbeiten durchgeführt worden.

Die Untersuchungen sollten zunächst Anhaltspunkte bringen, welche Erfordernisse an die Nucleobase zu stellen sind, damit eine Reaktion überhaupt abläuft. Im zweiten Teil sollten Beziehungen zwischen den bei kinetischen Messungen gewonnenen Daten und den Veränderungen an der Base Auskunft über geschwindigkeitsbeeinflussende Faktoren am Substrat geben.

Da das Enzym sicher eine Katalyse vom Säure-Basen-Typ durchführt, wie aus der nichtenzymatischen Diesterspaltung bekannt ist, ist weiterhin anzunehmen, daß das Optimum der Aktivität durch den Protonierungszustand der an der Aktivierung beteiligten Gruppen des Enzyms bestimmt wird. Es kann erwartet werden, daß Messungen zur pH-Abhängigkeit der Reaktion Aufschluß über die pK-Werte der vom Protein her beteiligten Säuren- und Basengruppen geben. Mit Hilfe dieser Messungen sollte die Möglichkeit geschaffen sein, Vorstellungen über einen Wirkungsmechanismus zu entwickeln und neue Experimente für die volle Aufklärung anzuregen.

B. Isolierung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1

I. Verfahren zur Aktivitätsbestimmung

Zur Aufstellung einer Bilanz der Isolierung wurde die Enzymaktivität nach einem Verfahren von Uchida und Egami ¹⁶ bestimmt, indem die Extinktion der säurelöslichen Hydrolyseprodukte von Ribonucleinsäure gemessen wird. Die Durchführung ist im experimentellen Teil beschrieben (II.1).

Der Proteingehalt wird durch Messen der Absorption der Enzymlösung bei 280 nm bestimmt ¹⁷. Dabei wird der bei dieser Wellen-

^{*)} Luitpoldwerke, München

länge absorbierende Teil eines in den Rohfraktionen noch vorhandenen braunen Farbstoffes miterfaßt. Die übliche Annahme ¹⁷, daß bei 280 nm 1 mg Protein pro ml Puffer eine Extinktion von 1 zeigt, gilt deshalb nur grob. Auch liegt die Extinktion der reinen Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1 in einer Konzentration von 1 mg/ml bei 1,9 ¹⁰. Trotz dieser Einschränkungen kann in diesem Falle auf eine kompliziertere Proteinbestimmung nach Lowry ¹⁸ oder nach der Biuretmethode ¹⁹ verzichtet werden.

Schnellere Aktivitätsbestimmungen lassen sich mit einem registrierenden Spektralphotometer durchführen. Für die Ribonuclease T_2 wird der Absorptionsunterschied der cyclischen 2',3'-Pyrimidinnucleotide als Substrat und der 3'-Pyrimidinnucleotide als Produkt zwischen 275 nm - 300 nm ausgenutzt. Man registriert den Anstieg der Extinktion bei einer geeigneten Wellenlänge. 1 ml einer millimolaren Substratlösung wird in eine Halbmikroküvette gefüllt und die Reaktion durch Enzymzugabe gestartet. Nach Beendigung der Reaktion entspricht die Gesamtänderung der Absorption dem Umsatz von 1 μ Mol Substrat. Als eine Enzymeinheit wird die Spaltung von 1 μ Mol Substrat in der ersten Minute definiert. Da die Spaltungsgeschwindigkeit für verschiedene Substrate etwas variiert, wurde 2',3'-cyclische Cytidylsäure als Bezugs-substrat gewählt.

Bei der Ribonuclease T_1 wird mit GpC als Substrat nach der gleichen Methode verfahren. Hier wird der Hypochromieeffekt im Maximum (255 nm) ausgenutzt. Die Substratkonzentration beträgt 0,1 μ Mol pro ml. Eine Einheit ist die Enzymmenge, die 0,1 μ Mol GpC in der ersten Minute spalten würde.

II. Isolierung

Ausgangsprodukt ist ein Enzymextrakt aus *Aspergillus oryzae*. Er enthält eine Reihe Proteine, Kohlenhydrate, einen schwer abtrennbaren braunen Farbstoff und niedermolekulare Begleitstoffe. Mit Hilfe von Sephadex ^{*)} G 75 wird durch Gelfiltration in 0,1 M NaHCO_3 -Lösung im ersten Schritt von großen Mengen dieser

^{*)} Deutsche Pharmacia, Frankfurt

niedermolekularen Begleitstoffe abgetrennt. Der Auslauf wird dabei über einen Uvikord ^{*)} geleitet, der die Durchlässigkeit kontinuierlich registriert. Es erscheint zunächst ein Absorptionspeak mit hochmolekularen Proteinen, der inaktiv ist und verworfen wird. Der zweite Absorptionspeak enthält die Ribonuclease T₂. Nach einem Absorptionsminimum erscheint ein dritter hoher Peak, der den braunen Farbstoff und andere niedermolekulare Begleitstoffe enthält. Die Ribonuclease T₁ befindet sich im Anfangsteil dieses Peaks. Abbildung 1 zeigt den Elutionsverlauf.

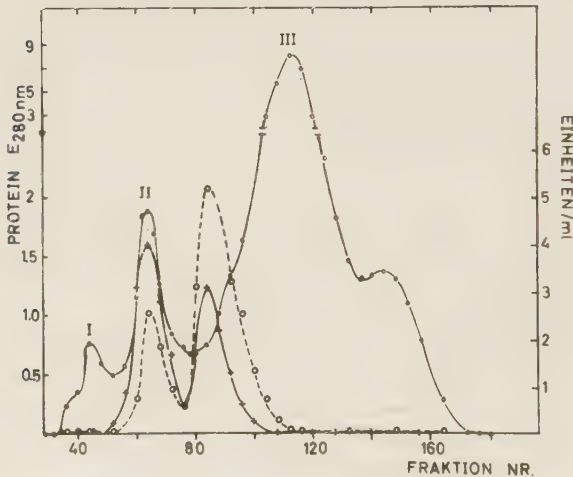


Abb. 1 Elutionsverlauf von 20 ml des rohen Enzymextrakts an Sephadex G 75. Säule: 7 x 140 cm. Puffer: 0,1 M NaHCO₃. Elutionsgeschwindigkeit: 80 ml pro Stunde. Fraktion: 20 ml pro Fraktion. Elutionsdauer: 24 Stunden. Protein —○—. Aktivität pH 4.5 —+—. Aktivität pH 7.5 ---○---.

^{*)} LKB, Schweden

Beide Ribonucleasenfraktionen werden mit Kationenaustauscher (Dowex 50 W x 8) entsalzt und anschließend gefriergetrocknet. Sie sind im Eisschrank haltbar.

Für die nächste Operation wird das Produkt aus mehreren Ansätzen vereinigt, in wenig Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung im Eisbad mit 2 N H_2SO_4 auf pH 1.6 - 1.8 gebracht. Hierbei werden eine Reihe Begleitproteine denaturiert und zur Ausfällung gebracht. Der voluminöse Niederschlag wird abzentrifugiert, der Überstand neutralisiert, eingeengt und erneut über Sephadex G 75 in destilliertem Wasser entsalzt. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und an Sephadex DEAE - A 50 Anionenaustauscher absorbiert. Die Elution erfolgt mit einem Phosphatpuffer-Kochsalz-Gradienten. Nach Gelfiltration an Sephadex G 75 zur Entsäuerung wird die Ionenaustauschchromatographie an Sephadex DEAE-A 50 wiederholt. Nach erneuter Entsäuerung an G 75 wird gefriergetrocknet. Bei einer Gesamtausbeute von 8% wurde eine 780 fache Anreicherung erzielt.

Die Ribonuclease T_1 wurde nach dem gleichen Verfahren isoliert. Nach Feststellung der chromatographischen und elektrophoretischen Einheitlichkeit des Enzyms wurden weitere Versuche zur Steigerung der spezifischen Aktivität zurückgestellt. Das Präparat war noch leicht gelb gefärbt. Beide Isolierungsschritte sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

III. Versuche zur Charakterisierung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1

1. Prüfung der Einheitlichkeit

Säulenchromatographie

Die Einheitlichkeit der Elutionspeaks bei der Ionenaustauschchromatographie und der Gelfiltration kann als erstes Kriterium herangezogen werden. Enzymaktivität und Proteinabsorption stimmen überein. Die Elutionsbilder zeigen Abb. 2 - 5.

Isolierungs- schritt	Gesamtprotein (in g)	Gesamtaktivität (Einheiten) pH 4.5	spezifische Aktivität	Ausbeute in %	Ausbeute in % nach Abtrennung der RNase T ₁	Reinigung
Rohextrakt (95 ml)	45,6	16500	0,36	100	-	1
Gelfiltration Sephadex G 75	2,18	5070	2,3	31	100	7
Säurebehandlung H ₂ SO ₄ pH 1.6-1.8	0,81	3640	4,5	22	70	9
Gelfiltration Sephadex G 75	0,16	3300	21	20	65	58
Ionenaustausch Sephadex DEAE-A50	0,047	2390	51	14	47	142
Gelfiltration Sephadex G 75	0,008 ₅	1540	190	9,2	30	528
Ionenaustausch Sephadex DEAE-A50	0,005 ₁	1410	282	8,1	28	781

Tab. 1 Daten zur Isolierung der Ribonuclease T₂ (Einzelheiten zur Isolierung siehe Experimenteller Teil I)

Isolierungs- schritt	Gesamtprotein (in g)	Gesamtaktivität (Einheiten) pH 7,5	spezifische Aktivität	Ausbeute in %	Ausbeute in % nach Abtrennung der RNase T ₂	Reinigung
Rohextrakt (95 ml)	45,6	12700	0,27	100	-	1
Gelfiltration Sephadex G 75	3,19	6510	2,0	51	100	7
Säurebehandlung H ₂ SO ₄ pH 1.6-1.8	-	-	-	-	-	-
Gelfiltration Sephadex G 75	1,73	2350	1,4	19	36	5
Ionenaustausch Sephadex DEAE-A50	0,33	1180	3,5	9,3	18	13
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0 Sättigung	0,18	803	4,4	6,3	12	16
Ionenaustausch Sephadex DEAE-A50	0,058	765	13	6,0	11,5	48
Ionenaustausch Sephadex DEAE-A50	0,031	630	20	5,0	9,7	70

Tab. 2 Daten zur Isolierung der Ribonuclease T₁ (Einzelheiten zur Isolierung siehe Experimenteller Teil I)

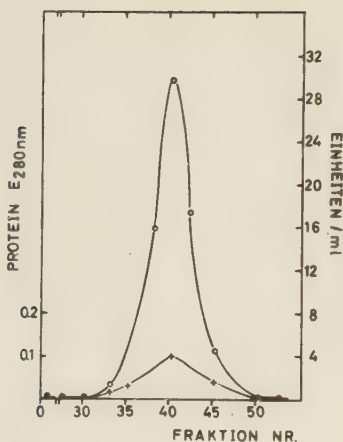


Abb. 2 Elutionsverlauf hochgereinigter RNase T₂ an Sephadex DEAE-A50, Säule: 1,2x30cm Gradientenelution, Anfangspuffer: 0,5 l 0,005 M Na₂HPO₄ pH 8,2, Endpuffer: 0,25 M NaH₂PO₄ + 0,25 M NaCl pH 4,1 Elutionsgeschwindigkeit: 60 ml pro Stunde, Elutionsdauer: 10 Stunden, Fraktionen: 10 ml pro Fraktion, —+— Protein —o— Aktivität

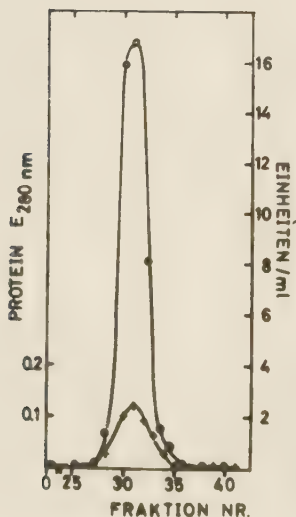
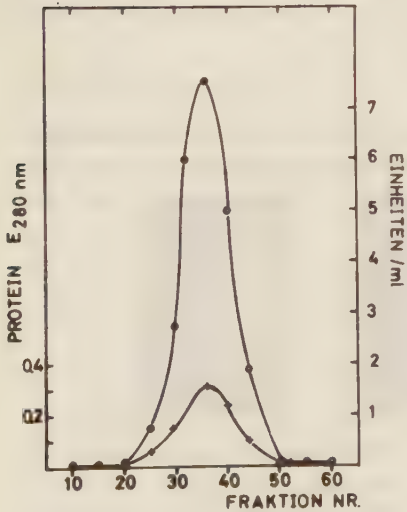
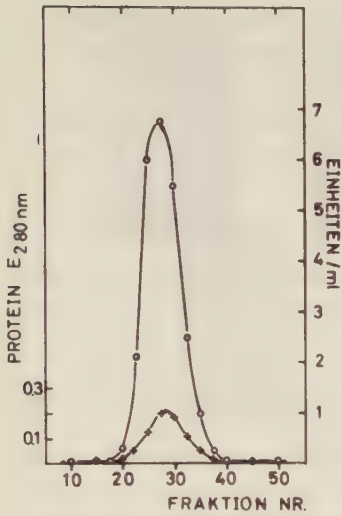


Abb. 3 Gelfiltration von RNase T₂ an Sephadex G 75, Puffer: 0,1 M NaHCO₃, Säule: 3 x 140 cm, Elutionsgeschwindigkeit: 50 ml pro Stunde, Elutionsdauer: 24 Stunden, Fraktionen: 20 ml pro Fraktion, —+— Protein —o— Aktivität



Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese²⁰, im experimentellen Teil beschrieben (VII), ist die wohl zur Zeit empfindlichste Methode des Proteinnachweises.

Nach Elektrophorese und Anfärben mit Amidoschwarz erkennt man jeweils nur ein einziges Proteinband.



Abb. 6 Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese (Durchführung siehe Experimenteller Teil, VII) a) Rohextrakt, b) RNase T_2
c) RNase T_1

Ultrazentrifuge *)

Die geprüften Ribonuclease T_2 - und Ribonuclease T_1 -Präparate erwiesen sich in der Ultrazentrifuge als einheitlich.



Abb. 7 Sedimentationsbild reiner RNase T_2 , Puffer: pH 6.8, Enzymkonzentration: 0,01 g/ml, Aufnahmen nach 20,28 u.44 Min.

*) Die Reinheitsprüfung an der Ultrazentrifuge wurde freundlicherweise von den Behring-Werken, Marburg durchgeführt. Ich danke den Herren Dr. Schwick, Dr. Kranz und Dr. Becker.

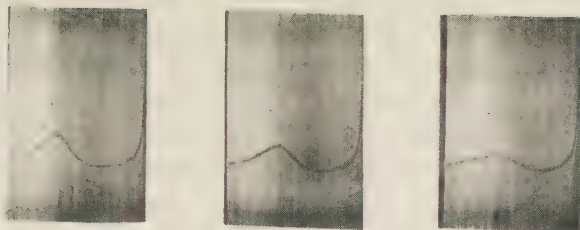


Abb. 8 Sedimentationsbild reiner RNase T_1 , Puffer: pH 6,8, Enzymkonzentration: 0.01 g/ml, Aufnahmen nach 10, 18 und 42 Min.

Versuche zur Gewinnung eines Antiserums *)

Die im Rohprodukt zur Verfügung stehende Enzymmenge führte nur zur Bildung einer Reihe von Antikörpern gegen Begleitproteine. Sowohl im Geldiffusionstest nach Ouchterlony als auch in der Immunoelktrophorese nach Scheidegger sind gegen hochgereinigte Enzympräparate die Präcipitate für diese Begleitproteine verschwunden. Das ist jedoch kein Ausschluß für die Anwesenheit anderer Proteine, die ebenfalls wie die Ribonucleasen T_2 und T_1 keine Antikörperbildung hervorgerufen haben.

Phosphatasenaktivität

Aktivitätsbestimmungen auf Anwesenheit von Phosphatasen und Phosphodiesterasen fielen auch nach 18 Stunden bei 37°C negativ aus. Die Durchführung ist im experimentellen Teil (III) beschrieben ^{21,22}.

Für die Ribonuclease T_1 ist die Substratspezifität eine zusätzliche Sicherung für die Abwesenheit anderer Nucleasen.

2. Chemische und physikalische Eigenschaften der Ribonuclease T_2

Nach Egami et.al.¹⁰ errechnet sich aus der Summe der 325 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 36700.

*) Für die freundliche Unterstützung zur Gewinnung des Antiserums danke ich Herrn Dr. Geyer, Zoologisches Institut der Universität Marburg.

Das UV Spektrum zeigt nach Egami et.al.¹⁰ bei 281 nm ein Maximum, das Minimum liegt bei 252 nm. Der Quotient aus $E_{\text{max}}/E_{\text{min}}$ ist mit 2.52 angegeben¹⁰. Rushizky et.al.¹² errechnen für $E_{280 \text{ nm}}/E_{260 \text{ nm}}$ ein Verhältnis von 1.51. Ein mg Protein pro ml Pufferlösung besitzt bei 280 nm etwa eine Extinktion von 1.9^{10,11}. Bei der von mir isolierten Präparation liegt das Absorptionsverhältnis $280_{\text{nm}}/260_{\text{nm}}$ bei 1.70. Für $\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{min}}$ gilt 1.92. Das UV Spektrum zeigt Abbildung 9.

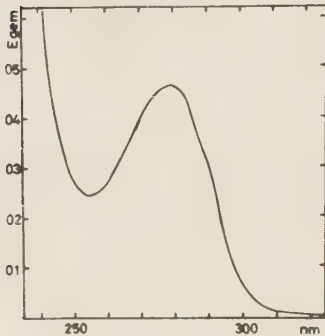


Abb. 9 UV-Spektrum der
RNase T_2 in DMGS/NaOH vom
pH 6.6

Anders als die Ribonuclease T_1 ist die Ribonuclease T_2 ein neutrales Protein^{10,11,23}. Der isoelektrische Punkt liegt etwa bei pH 6.

Eine Überprüfung der Daten lag nicht im Rahmen dieser Arbeit.

IV. Diskussion

Käufliches Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1 war bisher immer Takadiastase^{1-6,12}, ein Hydrolasensextrakt aus *Aspergillus oryzae*.

In dieser Arbeit wurde der in Deutschland zugängliche Luizym-Sirup benutzt.

Der hohe Gehalt an Kohlenhydraten im verwendeten Luizym-Sirup, der aus dem *Aspergillus*-Kulturen zugesetzten Malz stammt, erschwert jedoch die Isolierung beträchtlich.

Anfangs gab das Verfahren von Rushizky und Sober²³ die Richtlinien für die Isolierung. Jedoch konnten die beiden Ribonucleasen auch unter genauer Beachtung der angegebenen Arbeitsvorschriften nicht sauber erhalten werden. Die eingeschaltete Dialyse war vor allem an Ribonuclease T_1 wegen des relativ kleinen Moleküls (MG 11127) verlustreich. Durch Acetonfällung und Ionenaustauschchromatographie konnte der braune Farbstoff vom Protein nicht abgetrennt werden^{27,28}. Auch Ammoniumsulfat-Fällungen bei der Präparation der Ribonuclease T_1 brachten keinen wesentlichen Fortschritt.

Die an Egami et.al.¹⁰ angelehnte Anwendung von saurem Aluminiumoxid zur Abtrennung des Farbstoffs blieb erfolglos. Eine Reinigung wurde nicht erzielt. Versuche, den Farbstoff an Aktivkohle zu adsorbieren endeten damit, daß auch das Enzym vollständig adsorbiert wurde und nur zusammen mit dem Farbstoff wieder eluiert werden konnte.

Es wurde deshalb versucht, die gesamte Reinigung nur über Sephadex-Gelfiltration und Sephadex-Ionenaustausch-Chromatographie durchzuführen. Nach einer Reihe von Vorversuchen ergab das in dieser Arbeit beschriebene und recht einfache Verfahren zufriedenstellende Ausbeuten und einheitliche Enzyme. In der angegebenen Form dauert die Isolierung etwa 6 Tage.

Reinigungseffekt und Ausbeute der Ribonuclease T_2 sind mit den Werten in der Literatur^{11,12} vergleichbar. Die Ausbeute ist sogar noch zweimal größer als von Egami et.al.¹¹ angegeben.

Für größere Ansätze könnte ein zweites Verfahren angewandt werden, das sich im ersten Teil an die Methode von Rushizky und Sober²³ anlehnt. Es wird zunächst eine Säurefällung durchgeführt, an die sich nach Abzentrifugieren der ausgefallenen denaturierten Proteine und Abstumpfen des pH-Wertes eine Acetonfällung anschließt. Der zentrifugierte Niederschlag wird in wenig Puffer gelöst und dann wie im ersten Verfahren über Sephadex G 75 getrennt.

Der Fortschritt der Reinigung in den einzelnen Schritten läßt sich einfach durch die Disc-Elektrophorese²⁰ verfolgen.

C. Basenspezifität

I. Untersuchungen zur Abgrenzung der Basenspezifität

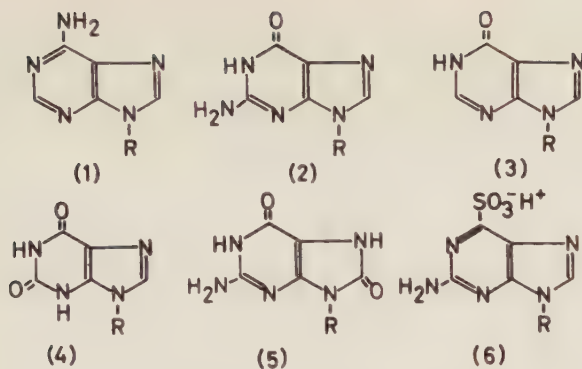
Die erste Vermutung von Egami et.al.²⁸, daß saubere Ribonuclease T_2 , analog zur Ribonuclease T_1 , spezifisch nur Adenylsäurediesterbindungen löst, entstand durch die Beobachtung, daß bei Inkubation mit einer erst vorgereinigten Enzympräparation Oligonucleotide entstehen, die vorwiegend Adenylsäure als endständiges Nucleotid besitzen. Egami selbst^{10,29} und Rushizky und Sober¹¹ zeigten später, daß auch saubere Ribonuclease T_2 alle Phosphodiesterbindungen der Ribonucleinsäure, wenn auch mit einer Vorliebe für Adenylsäurebindungen, hydrolysiert. An Trinucleotiden mit unterschiedlicher Basensequenz stellten Rushizky und Sober¹¹ jetzt fest, daß keine wesentlichen Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit für die einzelnen Diesterbindungen auftreten. Auch die Phosphodiesterbindungen der sogenannten seltenen Nucleotide wie Pseudouridylsäure, 5.6 Dihydrouridylsäure werden nach Untersuchungen von Madison und Holley³⁰ an der transfer-Ribonucleinsäure hydrolysiert. Fehlt die Nucleobase wie beim β -Methylribose-2',3'-phosphat³¹, erfolgt keine Spaltung^{11,14}.

Zur Feststellung der Minimalanforderung wurde in dieser Arbeit zunächst qualitativ geprüft, wie weit die einzelnen Strukturelemente der Nucleobasen verändert werden können.

Purinderivate

Um einen möglichen Einfluß von Substituenten in der 2-, 6- und 8-Stellung zu erfassen, wurden folgende 2',3'-cyclischen-Phosphodiester auf ihre Hydrolysierbarkeit untersucht: Adenylsäure (1), Guanylsäure (2), Inosinsäure (3), Xanthylsäure (4), 8-Hydroxy-Guanylsäure (5)¹⁴ und 6-Sulfonsäure-Guanylsäure (6)¹⁴.

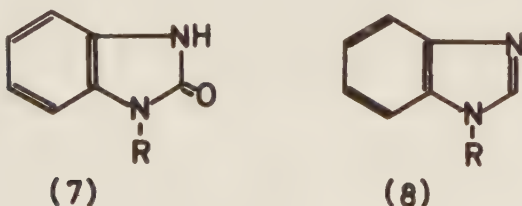
Alle Diester werden hydrolysiert. Substituenten in der 2-, 6- und 8-Position sind demnach ohne Bedeutung für die Reaktion.



R = Ribose - 2',3'-cyclo-phosphat

Nucleotide ohne Stickstoff und ohne Substituenten im 6-Ring.

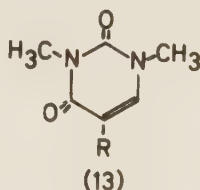
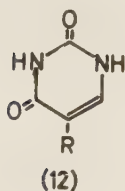
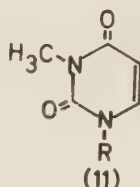
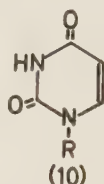
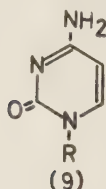
2',3'-cyclische Phosphodiester des Benzimidazolnribofuransids (7) ³² und des Benzimidazolribofuransids (8), dessen Synthese unter C.II.1 beschrieben ist, werden ebenfalls hydrolysiert.



Es ist jedoch auffällig, daß das Benzimidazolribofuransyl-2',3'-cyclo-phosphat wesentlich langsamer als das entsprechende Nucleotid des Benzimidazolons hydrolysiert wird. Unter den möglichen Gründen kann eine geringere Hydrophilie, aber auch ein geringerer induktiver Effekt über die Glycosidbindung auf die Phosphatgruppe diskutiert werden.

Pyrimidinderivate

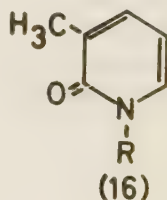
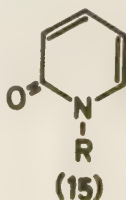
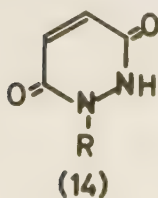
Von den Pyrimidinderivaten wurden 2',3'-cyclische Phosphodiester der α - wie auch der β -Cytidylsäure (9), Uridylsäure (10), 3-Methyluridylsäure (11), Pseudouridylsäure (12) und 1,3 - Dimethylpseudouridylsäure ^{1,33}(13) eingesetzt.



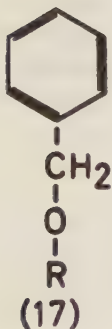
Alle Verbindungen werden hydrolysiert. 2',3'-cyclische 3-Methyluridylsäure (11) und 2',3'-cyclische 1,3-Dimethylpseudouridylsäure (13) werden durch Pankreas-Ribonuclease nicht gespalten, was wieder den Hinweis liefert, daß keine spezifische Funktion der Nucleobase angenommen werden kann, etwa in Form der dort gefundenen Beteiligung an der Katalyse ^{1,33}.

Pyridin- und Pyridazinderivate ^{1,33}

Untersucht wurden die 2',3'-cyclischen Phosphodiester des 3,6-Dioxypyridazinribofuranosids (14), des Pyridonribofuranosids (15) und des 3-Methylpyridonribofuranosids (16).



Da alle Verbindungen hydrolysiert werden, kann die Natur der Ringstruktur nicht für die Reaktivität verantwortlich gemacht werden.



O-Glycoside

Der 2',3'-cyclische Phosphodiester des Benzylribofuranosids (17), dessen Synthese unter C.II.2 beschrieben wird, zeigte bei Inkubierung mit der für die anderen Diester benutzten Enzymkonzentration ($10^{-7}M$) keine Spaltung. Bei etwa hundertfach höherer Enzymkonzentration wurde auch dieser Diester gespalten, während von Uchida und Egami ^{11,14} beim 2',3'-Phosphodiester des Methylribofuranosids keine Spaltung mehr beobachtet wurde.

II. Zur Synthese der dargestellten Modellester

Die ausgewählten Modellester können aus Nucleobase, Ribose und Phosphorsäure aufgebaut werden ³²⁻³⁶.

1. Benzimidazol-1-β-D-ribofuranosyl-2',(3')-Phosphat

Nach Davoll und Lowy ³⁷ wird die Monoquecksilberhalogenverbindung der Base eingesetzt. Hierzu wird Benzimidazol in einer äquimolaren Menge Natronlauge gelöst und das erhaltene Natriumsalz mit einer alkoholischen Lösung von Quecksilber (II)-chlorid versetzt. Die Kondensation mit 1-Chlor-2,3,5-tri-O-benzoylribose ^{33,32,60} wird in siedendem Xylol durchgeführt. Das 2',3',5'-tri-O-benzoyl-benzimidazon-ribosid wird mit Ammoniak in absolutem Methanol vier Tage bei 4°C hydrolysiert. Das Ribosid wird dann aus Wasser umkristallisiert und mit β-Cyanoäthylphosphat phosphoryliert. Um die 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe zu phosphorylieren, muß vorher die primäre Alkoholgruppe in 5'-Stellung mit p-Methoxyphenyldiphenylchlormethan ³⁹ veräthert werden. Die Phosphorylierung des so geschützten Nucleosids verläuft glatt und in guten Ausbeuten. Durch Ätherspaltung in 80%iger Essigsäure (3 Stunden) und anschlies-

sender alkalischer Hydrolyse in 3N-Ammoniak bei 55°C (3 Stunden) erhält man das Gemisch des 2'- und 3'-Benzimidazolnucleotids.

2. 1-O-Benzyl-β-D-ribofuranosyl-2', (3')-phosphat

1-O-Benzyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-ribofuranosid fällt aus einer Lösung von 1-Chlor-2,3,5-tri-O-benzoylribofuranose in Benzylalkohol kristallin aus ^{40,33,32}. Die Schutzgruppen des Tribenzoylnucleosids können mit $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ abgespalten werden ^{33,32}. Die Phosphorylierung geschieht wie beim Benzimidazolribofuranosid.

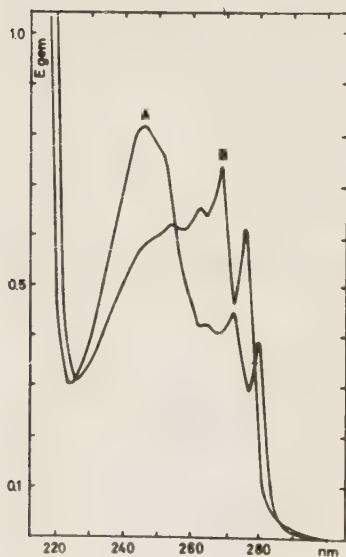


Abb. 10 UV-Spektrum des Benzi- midazol-1-β-D-ribofuanosyl- 2'(3')-phosphat (8)
A: pH 7; B: pH 1

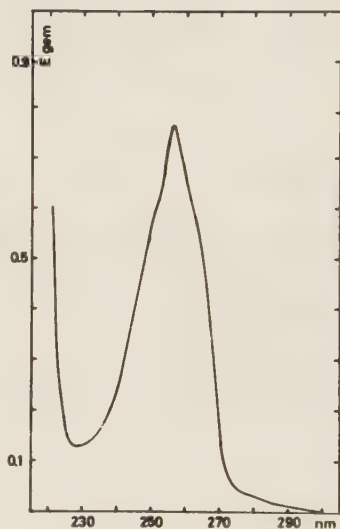


Abb. 11 UV-Spektrum des 1-O- Benzyl-β-D-ribofuranosyl-2'(3')- phosphat (17)

Die 2',3'-cyclischen Diester der dargestellten Nucleotide werden nach einem in Abschnitt F.VI.3 beschriebenen Verfahren mit Carbodiimid ⁵⁴ synthetisiert.

Phosphorylierungsversuche mit Triäthylphosphit nach Holy und Scheit ⁴¹ und anschließender Oxydation mit Hexachloraceton zum 2',(3')-phosphat verliefen bei diesen Modellnucleosiden unbefriedigend.

III. Diskussion

Die Versuche zu einer qualitativen Abgrenzung der Erfordernisse, die bezüglich der glycosidischen Komponente für die Reaktion notwendig sind, lassen auf den ersten Blick keine spezifischen Gruppierungen erkennen. Alle substituierten Positionen der natürlichen Nucleoside lassen sich verändern.

Für die Ribonuclease T₂ kann demnach eine Funktion der Base wie bei der Ribonuclease T₁ oder der Pankreas-Ribonuclease nicht gesehen werden.

Dennoch bleibt die Glycosidkomponente nicht ganz ohne jeden Einfluß. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird langsamer, je weniger das Ringsystem hydratisierbar ist. Beim Benzylribofuranosyl-2',3'-cyclo-phosphat gelingt eine Hydrolyse nur mit sehr hoher Enzymkonzentration. Auch zur Spaltung des Benzimidazol-Nucleotids ist eine höhere Enzymkonzentration notwendig als zur Hydrolyse des Benzimidazolon-Nucleotids oder der 8-Hydroxy-Guanylsäure, die im Fünfring mit dem Benzimidazolon identisch ist und nur im Sechsering eine andere Strukturierung aufweist. Dabei kann noch nicht gesagt werden, ob die Unterschiede nur auf der stärkeren Hydrophilie beruhen, oder ob noch andere Faktoren, etwa eine stärkere Polarisierbarkeit, innerhalb der Heterocyclen einen Einfluß auf die Geschwindigkeit ausübt.

Bald ³² konnte zeigen, daß dieser Faktor die Pankreas-Ribonuclease-Reaktion beeinflusst. Das 2',3'-cyclische Benzimidazolon-Nucleotid wird wesentlich langsamer als die 2',3'-cyclische 8-Hydroxy-Guanylsäure gespalten, obwohl die Katalyse nur durch die

die Ketogruppe im Imidazolring stattfindet. Da in diesem Fall die Ketogruppe einmal als Base dann als konjugate Säure geschwindigkeitsbestimmend in die Reaktion eingreift, spielt hier die Polarisierbarkeit beziehungsweise die Aktivierungsenergie, mit der die Base in die Form der konjugaten Säure übergehen kann und umgekehrt, eine entscheidende Rolle.

Diese Reaktion kommt jedoch für die Ribonuclease T_2 nicht in Frage, da auch Verbindungen ohne α -ständige Ketogruppe gute Substrate sind und sich 2',3'-cyclische-8-Hydroxyguanylsäure und 2',3'-cyclische-Guanylsäure in der Hydrolysegeschwindigkeit kaum unterscheiden.

Mit Sicherheit kann ausgeschlossen werden, daß die Nucleobase für eine Art hydrophobe Bindung sorgt, denn dann müßten die 2', 3'-cyclische Diester des Benzimidazolribofuranosids und des Benzylribofuranosids stärker als die anderen Nucleotide gebunden werden.

Das Gegenteil trifft zu. Es könnte eher die Feststellung getroffen werden, je hydrophober die Base, desto geringer die Hydrolysegeschwindigkeit. Die methylierten Verbindungen sind immer langsamer als die entsprechenden nichtmethylierten. Dann ist aber wieder der Unterschied zwischen Benzyl- und Methyl-ribofuranosyl-2',3'-cyclo-phosphat nicht zu verstehen.

Eine andere Möglichkeit, die einer folgenden experimentellen Prüfung zugänglich wäre, könnte in einem Einfluß der glycosidischen Gruppe auf die Elektrophilie am Phosphor gesehen werden. Hier gibt sich tatsächlich eine Reihenfolge, die mit dem Elektronenmangel in der Base einhergeht. Später, bei den quantitativen Untersuchungen, wird gezeigt, daß unter den 3',5'-Dinucleosidphosphaten die k_{+2} -Werte in der Reihenfolge Inosin (pK 8,8), Guanosin (pK 9,3), Uridin (pK 9,4), Cytidin und Adenosin abfallen. Es schließt sich das Benzimidazol mit pK 11,4 das Benzimidazol- und schließlich das Benzylglycosid an, während das 8-Methyl-ribonucleosid-2',3'-cyclo-phosphat nicht mehr reagiert 11,13.

Weitergehende Schlußfolgerungen lassen sich in diesem Abschnitt noch nicht ziehen. Hierzu müssen erst die im folgenden Kapitel

beschriebenen quantitativen Beziehungen, auch im Zusammenhang mit Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration, betrachtet werden, andererseits unter diesem Aspekt neue Modelle getestet werden.

D. Kinetische Untersuchungen

I. Die Katalyse durch die Ribonuclease T₂

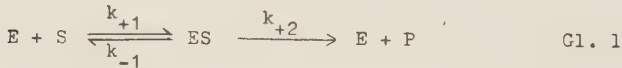
Nucleinsäure-Diester-Bindungen sind im neutralen pH-Bereich stabil. Die Hydrolyse wird durch Säuren und Basen katalysiert. Der Mechanismus der nichtenzymatischen Katalyse wurde von Witzel diskutiert ^{4,5,42}. Es werden cyclische 2',3'-Diester als Zwischenprodukte gebildet, die dann in einem weiteren Reaktionsschritt zu 2'-und 3'-Monoestern hydrolysiert werden.

Wie die Pankreas-Ribonuclease und Ribonuclease T₁ spaltet auch die Ribonuclease T₂ die 2',3'-Diesterbindungen im neutralen pH-Bereich. Die Katalyse verläuft in zwei Schritten, wobei zunächst durch Transphosphorylierung cyclische 2',3'-Nucleotide entstehen, die in einem folgenden Reaktionsschritt zu 3'-Nucleotiden hydrolysiert werden.

Da die Reaktion im neutralen pH-Bereich stattfindet, muß das Enzym entweder die Elektrophilie am Phosphor durch eine Protonierung oder die Nucleophilie an der 2'-OH-Gruppe durch eine Basenkatalyse erhöhen. Auch ein gleichzeitiger Angriff des Enzyms am Phosphor und an der 2'-OH-Gruppe ist denkbar. Die Protonierung müßte in diesem Fall durch das Enzym erfolgen, die Basenkatalyse an der 2'-OH-Gruppe könnte von ^{der} Nucleobase oder ebenfalls vom Enzym durchgeführt werden. Die qualitativen Untersuchungen haben jedoch bereits gezeigt, daß keine spezifische Gruppe an der Nucleobase existiert und dadurch kein Anhalt besteht, die Basenkatalyse wie bei der Pankreas-Ribonuclease innerhalb des Substrats zu suchen. Man darf auf Grund dieser Überlegungen bereits postulieren, daß die Aktivierung der 2'-OH-Gruppe vom Enzym her übernommen wird.

II. Die Theorie der Enzymkinetik

Die Interpretation der kinetischen Untersuchungen stützt sich auf die Theorie von Michaelis und Menten ⁴³ in der Formulierung von Briggs und Haldane ^{43a,44}. Der Verlauf einer Enzymreaktion wird nach folgendem Schema formuliert.



Enzym (E) und Substrat (S) bilden in einem sehr schnellen Gleichgewicht einen Enzym-Substrat-Komplex, der natürlich wieder rückläufig zerfallen kann, anderseits aber auch durch eine chemische Umformung in Enzym und Produkt zerfällt.

Da das Produkt (P) nur aus ES entstehen kann, folgt für die Reaktionsgeschwindigkeit

$$\frac{dp}{dt} = v = k_{+2} \cdot es \quad \text{Gl. 2}$$

(e: Enzymkonzentration, p: Konzentration des Produkts, es: Konzentration von ES). Die Geschwindigkeit für die Bildung von ES ist dann

$$\frac{d(es)}{dt} = k_{+1} \cdot s(e-es) - es(k_{-1} + k_{+2}) \quad \text{Gl. 3}$$

Bei Beginn der Reaktion stehen Bildung und Zerfall von ES im Gleichgewicht, d.h. $d(es)/dt = 0$. Die Annahme dieses stationären Zustandes gilt nur für das Anfangsstadium der Reaktion, das ja auch alleine ausgewertet wird.

Daraus folgt für es:

$$es = \frac{e \cdot s}{s + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}} \quad \text{Gl. 4}$$

Für das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten wird die Konstante K_m eingeführt.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{Gl. 5}$$

Für die Geschwindigkeit v folgt nach Gleichung 2

$$v = \frac{k_{+2} \cdot e}{1 + \frac{K_m}{s}} \quad \text{Gl. 6}$$

Die Beziehung für v gilt nur für den Anfang der Reaktion, solange s noch nicht merklich abgenommen hat. Nur die Anfangsgeschwindigkeit wird berücksichtigt.

Sobald bei hohen Konzentrationen von s die Sättigung des Enzyms erreicht wird, ist $es = e$.

Jetzt läuft die Reaktion mit der Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$.

Da $v = V_{\max}$ und $es = e$ erhält man aus Gl. 2

$$V_{\max} = k_{+2} \cdot e \quad \text{Gl. 7}$$

Für Gl. 5 ergibt sich dann

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{s}} \quad \text{Gl. 8}$$

Die nach 8 erhaltene Gleichung läßt sich durch Lineartransformation umformen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Gl. 9}$$

Nach dieser Gleichung von Lineweaver-Burk wurde in folgendem K_m und $V_{\max}$ durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen erhalten. Trägt man $1/v$ gegen $1/s$ auf, dann erhält man eine Gerade mit der Steigerung $K_m/V_{\max}$,

welche die $1/v$ -Achse bei $1/v_{\max}$, die $1/s$ Achse im Wert $-1/K_m$ schneidet. Da innerhalb einer Meßreihe aus meßtechnischen Gründen die Enzymkonzentration oft verändert werden muß, wurde statt $1/v$ gegen $1/s$ die Größe e/v gegen $1/s$ aufgetragen und statt $V_{\max}$ direkt k_{+2} erhalten.

$$\frac{e}{v} = \frac{K_m}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{k_{+2}} \quad \text{Gl. 10}$$

III. pH-Optimum

Verfolgt man die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeiten für die Spaltung von Dinucleosidphosphaten (erster Schritt) und für die Hydrolyse der 2',3'-cyclischen Nucleotide (zweiter Schritt)^{46,27,28}, so findet man zwei verschiedene pH-Optima.

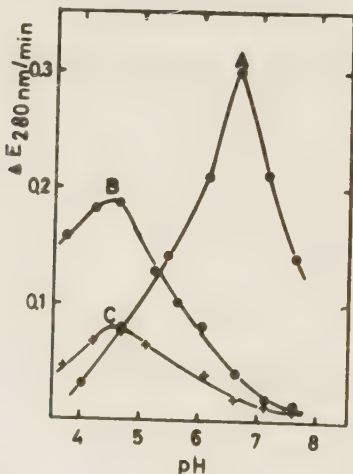


Abb. 12 Die pH-Abhängigkeit der RNase T_2 -Reaktion
A) 2',3'-Up, $1 \cdot 10^{-3}$ M, Enzymzugabe $5 \cdot 10^{-8}$ M, B) ApA, $5,4 \cdot 10^{-5}$ M, Enzym $6,8 \cdot 10^{-8}$ M, C) 3'-Up- α -naphthylester, $4,8 \cdot 10^{-5}$ M, Enzym $2,3 \cdot 10^{-8}$ M, Puffer: DMGS/NaOH, I = 0,2 ($\Delta E/\text{min}$ = Extinktionsanstieg nach 1 Minute unter den angegebenen Bedingungen)

Das pH-Optimum für die 2',3'-cyclischen Nucleotide bei etwa pH 6.5 ist auch von Sato et.al.⁴⁶ gefunden worden. Untersuchungen an Dinucleosidphosphaten ergaben ein ähnliches Kurvenbild wie für die Ribonucleinsäure. Das pH-Optimum für die Ribonucleinsäure wird mit pH 4,5 angegeben.

Hieraus kann geschlossen werden, daß bei beiden Reaktionen grundsätzliche Differenzen bezüglich der aktivierenden Gruppen des Enzyms bestehen.

Im Gegensatz dazu steht allerdings eine halbquantitative Untersuchung der Diesterspaltung von 3'-Benzylestern der Adenyl- und Guanylsäure, die ihr pH-Optimum ebenfalls etwa bei pH 6 haben sollen.⁴⁶

IV. Untersuchungen zur Abhängigkeit der K_m - und k_{+2} -Werte vom pH-Wert und von der Natur der Base.

Da das pH-Optimum der Überallesreaktion der cyclischen Diester nicht mit dem der Dinucleosidphosphate übereinstimmt, müssen offensichtlich Unterschiede im Reaktionsablauf bestehen, je nachdem ob die 2'-OH-Gruppe oder ein Wassermolekül aktiviert werden muß. Es wurden aber auch Geschwindigkeitsunterschiede zwischen analog aufgebauten Verbindungen gefunden. Daher war es zunächst notwendig, die K_m - und k_{+2} -Werte für zwei verschiedene 2',3'-cyclischen Diester in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration zu bestimmen, um dann diese Ergebnisse mit Messungen an Dinucleosidphosphaten zu vergleichen.

Die Untersuchungen an 2',3'-cyclischen Pyrimidinnucleotiden sind durch die Verfolgung des Extinktionsanstieges bei 280 nm bzw. 290 nm mit der Hydrolyse zu den 3'-Monophosphaten sehr leicht durchführbar.

Die Spaltung der Purinnucleotide zeigt bei der Hydrolyse zum Monoester keine spektrale Änderung, so daß hier nur das pH-stat-Verfahren, dieses aber auch nur bis etwa pH 6, anwendbar ist.

Bei der Spaltung der Dinucleosidphosphate mit Pyrimidinnucleosiden in 3'-Stellung kann der Extinktionsabfall während der Umesterung gemessen werden. Voraussetzung ist jedoch, daß der folgende Anstieg der Extinktion, der mit der Hydrolyse der cyc-

lischen Phosphodiester beginnt, wesentlich langsamer als der erste Schritt ist. Besteht dieser Geschwindigkeitsunterschied nicht, so ist diese Methode nicht anwendbar. Es müssen dann, wie auch für die Dinucleosidphosphate mit Purinnucleosiden in 3'-Stellung, die diese spektrale Änderung nicht zeigen, andere Effekte zur Verfolgung der Kinetik herangezogen werden. Bei der Spaltung der 3',5'-Dinucleosidphosphate steigt die Extinktion im Maximum an, verursacht durch einen Hypochromieeffekt infolge des "stacking-Phänomens" der Nucleobasen. In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit ermittelten Hypochromiewerte aufgeführt.

	pH								
	3,7	4,2	4,6	5,1	5,6	6,1	6,6	7,1	7,6
ApA	8,5	11,1	11,6	12,4	13,5	14,4	15,1	14,1	13,8
ApG	7,0	7,9	7,4	8,0	7,7	7,7	7,7	7,8	8,0
ApC	6,0	7,0	8,1	8,3	8,3	8,6	9,0	9,6	10,5
ApU	6,7	8,4	8,4	9,1	9,3	9,5	10,1		10,1
IpU			4,5		4,9	5,7			
GpA	4,0	5,0	5,1	5,0	5,1	5,2	5,4		5,4
GpU	5,2	5,0	5,0	5,0	5,0	5,3	5,3	5,1	5,1
CpA*	8,0	7,9	8,0	8,0	7,7	7,6	7,8	7,8	7,8
CpC*	6,9	5,7	6,6	6,3	6,7	6,7	6,9	7,0	7,0
UpA	5,5	5,9	5,9	6,1	6,1	6,0	5,9	6,2	6,3

Tab. 3 Hypochromie der eingesetzten Dinucleosidphosphate, Puffer: DMGS/NaOH, I = 0,2, 25°C

* Die Messungen wurden im isosbestischen Punkt von Cp(c) und Cp durchgeführt, der in der Reihenfolge der angegebenen pH-Werte bei nm 271, 269, 266, 264, 264,264, 264, 263, 263 liegt.

Trotz der geringeren Hypochromiewerte der Dinucleosidphosphate mit Pyrimidinbasen können kinetische Messungen noch erfolgreich durchgeführt werden. Eine Beeinträchtigung durch den folgenden zweiten Schritt besteht nicht.

Die Möglichkeit, mit dieser Methode kinetische Messungen der 3',5'-Diesterspaltung durchzuführen, beruht letztlich auf dem

glücklichen Umstand, daß die K_m -Werte sehr niedrig liegen und deshalb niedrige Substratkonzentrationen eingesetzt werden können. Dadurch bleiben die Bedingungen für eine Auswertung nach Lineweaver - Burk gewährleistet ⁴⁵.

1. Kinetische Untersuchungen an 2',3'-cyclischen Pyrimidinnucleotiden

Erste Untersuchungen zur Ermittlung von K_m und k_{+2} führten Seitz ²⁷ und Sato et.al. ⁴⁶ aus, letztere jedoch nur für K_m bei pH 6,0. Die Ergebnisse für K_m und k_{+2} sind mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Geringe Abweichungen sind durch die Anwendung verschiedener Puffer zu erklären. K_m - und k_{+2} - Werte von 2',3'-cyclischer Cytidylsäure und 2',3'-Uridylsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt Abbildung 13.

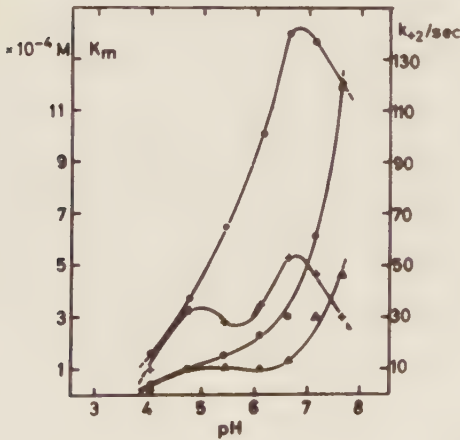


Abb. 13 K_m und k_{+2} in Abhängigkeit vom pH-Wert
Puffer: DMGS/NaOH, I = 0,2, —△— K_m Cp(c),
—○— K_m Up(c), —+— k_{+2} Cp(c), —●— k_{+2} Up(c)

Tabelle 3,5 auf Seite 68 gibt die für die entsprechenden pH-Werte erhaltenen kinetischen Größen wieder. Alle kinetischen Messungen sind, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, in β,β -Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer mit der Ionenstärke $I = 0,2$ durchgeführt. Einzelheiten über die Durchführung der Messungen sind im experimentellen Teil (IV,1) beschrieben.

Man sieht aus Abbildung 13, daß für 2',3'-cyclische Uridylsäure der K_m -Wert nach der sauren Seite hin abfällt, der k_{+2} -Wert steigt zunächst an, erreicht bei pH 6,5 ein Maximum und fällt dann ebenfalls nach der sauren Seite hin ab. Unterhalb von pH 4 ist sowohl K_m als auch k_{+2} so klein, daß sie nicht mehr exakt meßbar sind.

Bei der 2',3'-cyclischen Cytidylsäure liegen die Werte ähnlich, nur daß sie im Bereich von pH 8-6 um einen Faktor von drei niedriger liegen. Bei pH 5, offensichtlich mit der Protonierung des Cytidins, gleichen sie sich den Uridylsäure-Werten an.

2. K_m und k_{+2} in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer

Bei kinetischen Messungen mit der Pankreas-Ribonuclease, auf die nicht näher eingegangen werden kann, wurde gefunden, daß die kinetische Parameter vom Puffer, in dem die Messungen durchgeführt wurden, abhängig sind ^{47,48}. Untersuchungen über die Hydrolyse von 2',3'-cyclischer Uridylsäure in verschiedenen Pufferlösungen ergaben die in den Abbildungen 14 - 16 wiedergegebenen $e/v - 1/s$ Diagramme, deren Ergebnisse in den Abbildungen 17 und 18 veranschaulicht sind.

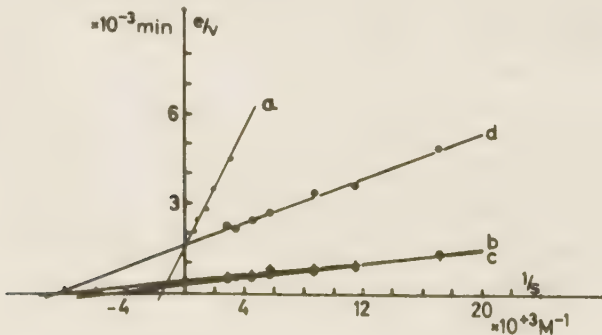


Abb. 14 pH 7,0

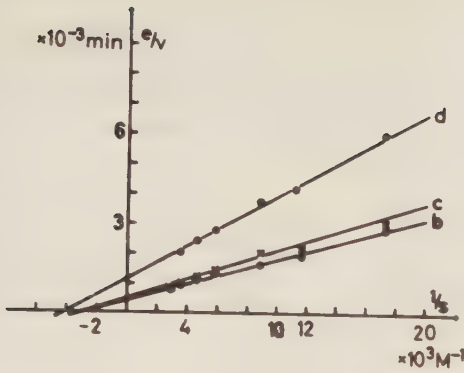


Abb. 15 pH 7,4

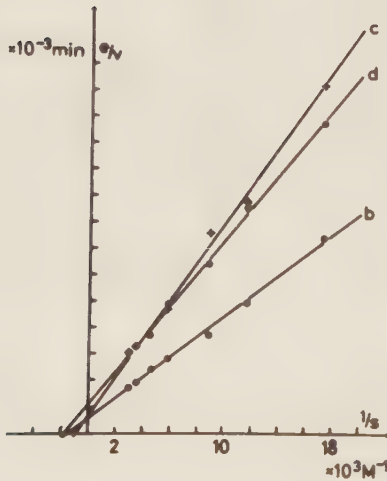


Abb. 16 pH 7,8

Hydrolyse von Up(c) in verschiedenen Puffern (a nur in Abb. 14, 17 und 18)

a) Dimethylglutarsäure/NaOH b) Dimethylglutarsäure/Tris

c) Tris/HCl d) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$

I = 0,2 25°C

Wie aus den Abbildungen 17 und 18 hervorgeht, differieren die K_m - und k_{+2} -Werte in Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem beträchtlich. So ist K_m für 2',3'-cyclische Uridylsäure, gemessen in Phosphatpuffer, etwa sechsmal kleiner als in Dimethylglutarsäure/NaOH-Puffer. Die k_{+2} -Werte unterscheiden sich sogar um einen Faktor von zwölf. Die Daten der Messungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. (Seite 68)

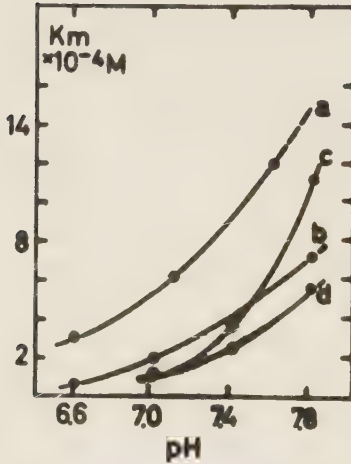


Abb. 17
 K_m in Abhängigkeit vom pH-Wert
und dem verwendeten Puffersystem

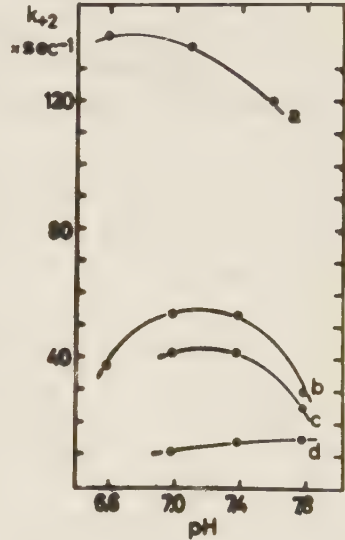


Abb. 18
 k_{+2} in Abhängigkeit vom pH-Wert
und dem verwendeten Puffersystem

3. Kinetische Untersuchungen an Dinucleosidphosphaten

Die benutzten Dinucleosidphosphate wurden nach dem Verfahren von Dimroth und Witzel ⁴⁹ isoliert.

Um Kenntnisse über den Mechanismus der Umesterung vom 3',5'-Phosphodiester zum 2',3'-cyclischen Diester zu erhalten, ist es wichtig, die pH-Abhängigkeit der Reaktion zu kennen. Rückschlüsse auf die Art der beteiligten funktionellen Gruppen lassen sich

dann eventuell aus den Einflüssen der Wasserstoffionenkonzentration auf die kinetischen Parameter ziehen. Aus den folgenden Abbildungen 19 und 20 ist der Verlauf der pH-Abhängigkeit von K_m für die Dinucleosidphosphate ApA, ApC, ApU, UpA, 3'-Up- α -naphthylester⁴⁸ und für IpU, GpU, CpC zu entnehmen.

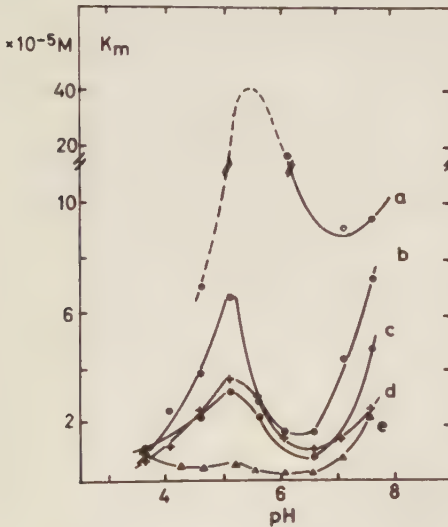


Abb. 19

pH-Abhängigkeit von K_m bei der Spaltung der Dinucleosidphosphate: a) 3'-Up- α -naphthylester, b) UpA, c) ApU, d) ApC, e) ApA, Puffer: DMGS/NaOH, $I = 0,2$

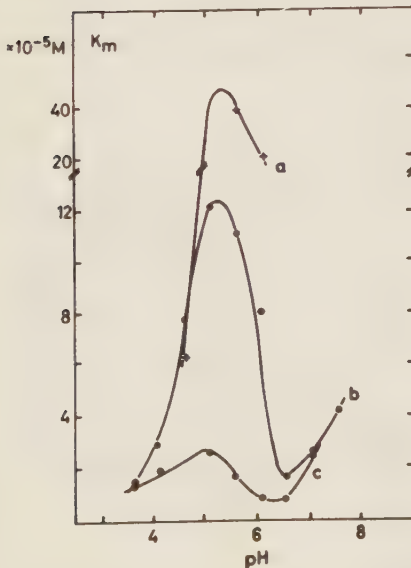


Abb. 20

pH-Abhängigkeit von K_m bei der Spaltung von: a) IpU, b) GpU, c) CpC, DMGS/NaOH, $I = 0,2$

K_m ändert sich in Abhängigkeit vom pH-Wert für die verschiedenen Substrate gleichsinnig. Im sauren Bereich steigt K_m zunächst an und erreicht bei pH 5,1 - 5,3 ein Maximum. Bei pH 6,5 findet man ein Minimum, dem nach der alkalischen Seite hin wieder ein Anstieg folgt.

Die zugehörigen k_{+2} -Werte zeigen die Abbildungen 21 und 22.

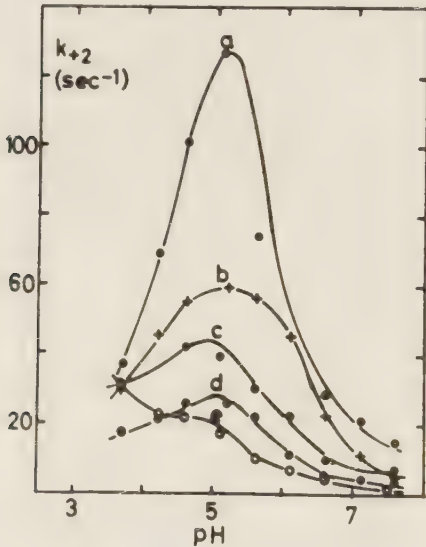


Abb. 21

pH-Abhängigkeit von k_{+2}
bei der Spaltung von:
a) UpA, b) CpA, c) ApU,
d) ApC, e) ApA
DMGS/NaOH, I = 0,2

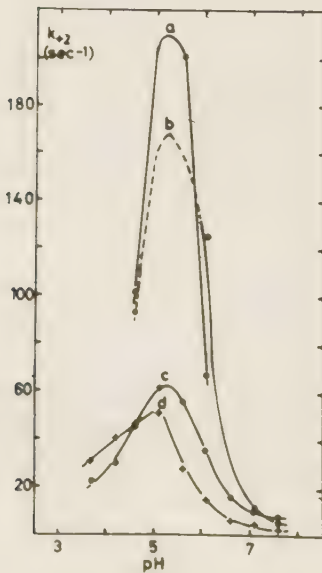


Abb. 22

pH-Abhängigkeit von k_{+2}
bei der Spaltung von:
a) IpU, b) 3'-Up- -
naphthylester, c) GpU,
d) CpC
DMGS/NaOH, I = 0,2

Das Maximum für k_{+2} liegt bei pH 5,2 - 5,3. Sowohl nach der sauren als auch nach der alkalischen Seite hin wird k_{+2} kleiner.

Bei den Dinucleosidphosphaten ApC, GpA und CpA in Abbildung 23 weichen mit Ausnahme des k_{+2} -Wertes für CpA sowohl das pH-Profil für K_m als auch für k_{+2} von den übrigen Dinucleosidphosphaten ab. K_m der Dinucleosidphosphate ApG, GpA und CpA zeigt bei pH 6,3-6,5 ein Maximum und bei pH 5,2, wo sonst ein Maximum ist, liegt für ApG und GpA ein Minimum. Nach der sauren Seite wird K_m wieder größer. Der K_m -Wert für CpA fällt jedoch ab. Auch das Maximum von k_{+2} für ApG und GpA ist nach der alkalischen Seite hin verschoben. Es liegt zwischen pH 6,0 und 6,3, wie aus Abbildung 24 ersichtlich wird.

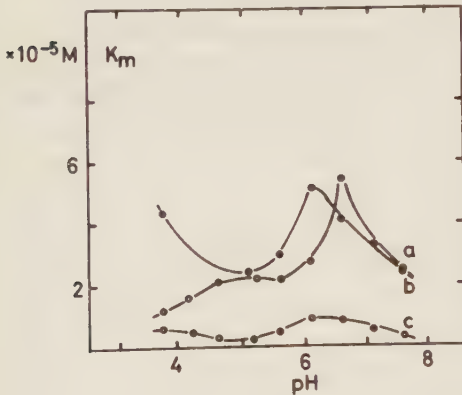


Abb. 23
pH-Abhängigkeit von K_m bei der Spaltung von: a) CpA, b) GpA, c) ApG

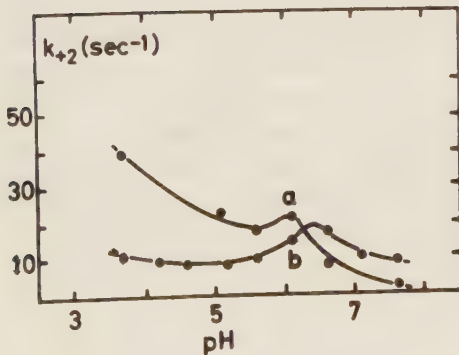


Abb. 24
pH-Abhängigkeit von k_{+2} bei der Spaltung von a) GpA und b) ApG

Die niedrigen K_m -Werte der Adenylsäureverbindungen spiegeln sich in den niedrigen K_i -Werten der Adenylsäure-Mononucleotide als Inhibitoren wieder, obgleich sich K_m und V_{max} der 2',3'-cyclischen Adenylsäure nur unwesentlich von den übrigen 2',3'-cyclischen Nucleotiden unterscheiden ⁴⁶.

ApA unterscheidet sich von den übrigen Dinucleosidphosphaten jedoch durch einen etwa zehnfach kleineren K_m -Wert. Die Ursache hierfür ist noch ungeklärt.

4. Ermittlung von pK-Werten

Aus den $\log k_{+2}/K_m$ -Kurven für 2',3'-cyclische Uridylsäure und das Dinucleosidphosphat UpA in Abbildung 14, stellvertretend für die anderen Substrate, läßt sich nach dem Verfahren von Dixon und Webb ¹⁷ ein pK-Wert von 6,6 - 6,8 ableiten.

K_m wird auf der sauren Seite nicht größer (Abb. 13 und 19), so daß für die Bindung des Substrats nur die eine Gruppe zu diskutieren ist.

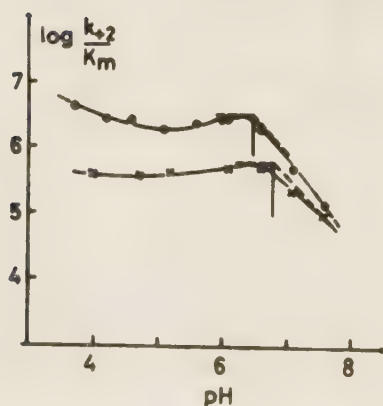


Abb. 25

$\log k_{+2}/K_m$ der Spaltung von 2',3'-cyclischer Up und UpA in Abhängigkeit vom pH-Wert

—○— UpA, —+— Up(c)

Aus $\log k_{+2}$ von UpA in Abbildung 26 lassen sich die pK-Werte 4,2 und 5,8 ableiten. Aus $\log k_{+2}$ von Up(c) wird ein pK-Wert von 5,8 ermittelt.

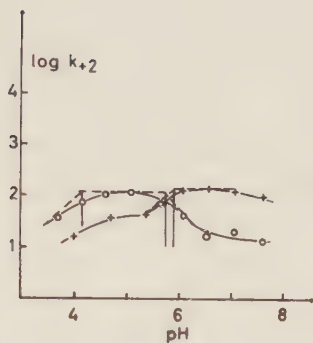


Abb. 26

$\log k_{+2}$ der Spaltung von UpA und Up(c) in Abhängigkeit vom pH-Wert

—○— UpA, —+— Up(c)

V. Hemmung der Reaktion durch verschiedene Modifizierer.

Um Anhaltspunkte zu bekommen, ob die Hydrolysereaktion außer durch die Phosphatgruppe noch durch andere Gruppen am Substrat beeinflusst wird, wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von 2',3'-cyclischer Cytidylsäure unter Zusatz gleicher Konzentrationen verschiedener Modifizierer spektrophotographisch verfolgt.

Zur Auswertung wird die Differenz zwischen der momentanen Extinktion und dem Endwert in Abständen von 30 sec. aus der Reaktionskurve entnommen und der Logarithmus dieser Differenz gegen die Zeit aufgetragen. Diese Meßpunkte liefern eine Gerade, deren Steigung $\lg \alpha$ ein Maß für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ist. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 27.

Die Meßdaten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

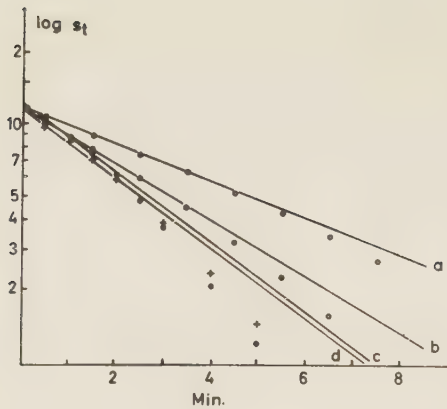


Abb. 27
Hydrolysegeschwindigkeit von Cp(c) unter Zusatz von Modifizierern, ermittelt durch Auftragen in halblogarithmischem System bei gleicher Substratkonzentration und Enzymmenge. c) Cp(c)
a) Cp(c)+2'-Cp b) Cp(c) + 3'-Cp d) Cp(c) + Cytidin.

Substrat	Modifizierer	tg α
Cp(c)	-	0,146
Cp(c)	Cytosin	0,146
Cp(c)	Cytidin	0,146
Cp(c)	5' - Cp	0,132
Cp(c)	3' - Cp	0,118
Cp(c)	5' - CTP	0,116
Cp(c)	2' - Cp	0,074
Cp(c)	2' - Cp - methylester	0,071

Tab. 4

Hydrolyse von Cp(c) unter Zusatz von Modifizierern
DMGS/NaOH, pH 6,3, I = 0,2, Substrat: $6,8 \times 10^{-4}M$,
Modifizierer: $6,8 \times 10^{-4}M$, Enzym: $5 \times 10^{-8}M$

Wie aus Abbildung 27 und Tabelle 4 ersichtlich wird, sind die Nucleobase Cytosin und das Nucleosid keine Hemmstoffe. Während 3'-Cytidylsäure und 5'-CTP nur sehr schwache Inhibitoren sind, hemmen 2'-Cytidylsäure und 2'-Cytidylsäure-methylester die Reaktion sehr deutlich.

VI. Diskussion

1. Vorschlag eines Mechanismus der Ribonuclease T_2 -Reaktion

Bei der von der Ribonuclease T_2 katalysierten Reaktion handelt es sich um die Hydrolyse einer 3',5'-Internucleotidbindung, die in zwei Schritten abläuft. Im ersten Schritt (S. 1 I-II) findet eine Umesterung statt. Die 2'-OH-Gruppe ist das am Phosphor angreifende Nucleophil, dafür tritt die 5'-OH-Gruppe aus; es wird ein 2',3'-cyclischer Diester gebildet. Im zweiten Schritt (II-III) tritt statt der ausgetretenen 5'-OH-Gruppe ein Wassermolekül ein. Die vorher geknüpfte 2'-O-P-Bindung wird dabei wieder gelöst. Wenn diese beiden Schritte vom gleichen aktiven Zentrum katalysiert werden und diese Katalyse auf der nucleophilen Seite ansetzt, dann muß gefordert werden, daß entweder eine Base existiert, die sowohl die 2'-OH-Gruppe als auch das Wassermolekül aktivieren kann, oder daß zwei verschiedene Basen existieren, von denen die eine im ersten Schritt an der 2'-OH-Gruppe wirksam wird, die zweite im zweiten Schritt am Wassermolekül.

Die erste Möglichkeit wird bei der Reaktion der Pankreas-Ribonuclease ausgenutzt, bei der die Pyrimidinbase diese Rolle intramolekular übernimmt (S. 2, I-VI). Dies bedingt, daß die Reaktion eine Substratspezifität für Diester mit solchen Nucleobasen aufweist, die diese Katalyse durchführen können. Es geschieht mit Hilfe eines zur Glycosidbindung α -ständigen Ketosauerstoffs. Dadurch sind nicht nur die Pyrimidinnucleotide Substrate, sondern auch Nucleotide mit den Basen 8 - Hydroxyguanin, α -Pyridon und 3,6 Hydroxypyridazin ^{1,32,33,50}. Verbindungen ohne die α -ständige Sauerstoff-Funktion sind keine Substrate.

Bei der Ribonuclease- T_2 kann die Base diese Rolle nicht spielen. Es werden alle natürlichen Nucleotiddiester gespalten, aber auch daraus abgewandelte oder neu synthetisierte Verbindungen, die keine Nucleotidstruktur mehr besitzen, wie zum Beispiel der 2',3'-cyclische Phospho-diester des Benzylribofuranosids (17). Dabei treten unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten auf, die zunächst nur auf qualitativer Basis beobachtet wurden. Unter den natürlichen Nucleotiden sind die Unterschiede sehr gering, sodaß

erst die quantitativen Untersuchungen eine Reihenfolge Inosin, Guanosin, Uridin, Cytidin, Adenosin ergeben. Beim Cytidin ist es gleich, ob die Nucleobase in α - oder β -Stellung steht. Unter den synthetisierten Verbindungen ergibt sich eine Reihenfolge: Pyridon- $\rightleftharpoons$ Benzimidazol- $\rightarrow$ Benzimidazol- $\rightleftharpoons$ 3-Methylpyridon- $\rightarrow$ Benzylribofuranosid. Es kann hierbei keine definierte Position an der Nucleobase für diese Geschwindigkeitsunterschiede verantwortlich gemacht werden. Man könnte einen Zusammenhang darin sehen, daß die letztgenannten Verbindungen relativ hydrophob sind. Dies könnte für den Fall eine Rolle spielen, daß das aktive Zentrum des Enzyms eine hydrophile Region mit vorwiegend polaren Aminosäuren darstellt. Dann dürfte aber erwartet werden, daß der 2',3'-cyclische Phosphodiester des Benzylribofuranosids langsamer als der Diester des Methylribofuranosids hydrolysiert wird, der jedoch gar nicht mehr angegriffen wird ^{10,46}.

Als zweite Möglichkeit könnte eine Abhängigkeit der Reaktion von einem induktiven Effekt diskutiert werden, der sich von der Nucleobase über die Glycosidbindung auf den 2'-Sauerstoff auswirkt. Eine Parallelität zwischen Geschwindigkeit und den pK-Werten für Inosin (8,75), Guanosin (9,30), Uridin (9,40), Benzimidazol (11,40) und Benzimidazol als relativ starke Base ist auffällig. Es paßt auch der Unterschied zwischen Benzyl- und Methylglycosid in dieses Bild, aber auch die Beobachtung, daß die Phosphodiester des N-3-Methyluridins und des 3-Methylpyridonribofuranosids langsamer als die entsprechenden nichtmethylierten Verbindungen hydrolysiert werden. Weiterhin ist aus der pH-Abhängigkeitskurve (Abb. 13) zu entnehmen, daß die 2',3'-cyclische Cytidylsäure im Bereich bis pH 5 langsamer als die 2',3'-cyclische Uridylsäure hydrolysiert wird, mit der Protonierung unterhalb pH 5 jedoch schneller wird und sich ein neues Maximum herausbildet, das bei der Uridylsäure nicht auftritt. Auch die Versuche von Uchida und Egami ¹³ liegen in dieser Richtung. Sie zeigen, daß Poly-Uridylsäure fünfmal schneller als Ribonucleinsäure mit allen vier Nucleotiden und diese etwa dreißigmal schneller als Poly-Adenylsäure gespalten wird. Es gibt derzeit kein Experiment, das im Widerspruch zu dieser Vorstellung steht, sodaß sie bis auf weiteres als Erklärung für die Geschwindigkeitsunterschiede ange-

nommen werden kann. Zur endgültigen Klärung sind Experimente mit analogen Basen vorzuschlagen, deren pK-Werte durch Substituenten ganz definiert geändert werden.

Nach diesen Ergebnissen kann die Nucleobase selbst nicht direkt in die Katalyse eingreifen. Dann muß aber gefordert werden, daß die Aktivierung der nucleophilen Seite vom Enzym übernommen wird. Eine Reaktion ist unter diesen Umständen jedoch nur möglich, wenn gleichzeitig eine Erhöhung der Elektrophilie am Phosphor erfolgt, wie bei der Pankreas-Ribonuclease ausführlich diskutiert worden ist ⁵¹. Da kein Metall als Lewis-Säure mitwirkt, muß eine Protonierung vorausgesetzt werden. Die Frage ob eine doppelte Protonierung wie bei der Pankreas-Ribonuclease oder nur eine einfache notwendig ist, ließ sich durch Hemmversuche klären. Die Ergebnisse auf Seite 38 zeigen, daß der dianionische Monoester, hier 2'-Cytidylsäure, gleich stark hemmt wie der monoanionische 2'-Cytidylsäure-methylester. Cytidin und 5'-Cytidylsäure oder auch 5'-Cytidintriphosphat hemmen erst bei sehr hohen Konzentrationen. Eine Mitwirkung der Base an der Bindung kann dadurch ausgeschlossen werden, wie es auch aus der fast gleichen Hydrolysegeschwindigkeit für α - und β -Cytidylsäure gefolgert werden muß. Dies heißt, daß die Phosphatgruppe zunächst nur als Monoanion gebunden wird, nicht als Dianion wie bei der Pankreas-Ribonuclease, wo der 2'-Cytidylsäure-methylester als Monoanion nicht hemmt, also auch nicht gebunden wird.

Weitere Anhaltspunkte für die Formulierung eines Mechanismus erhält man an Hand der kinetischen Daten, besonders ihrer pH-Abhängigkeit. Bei der 2',3'-cyclischen Uridylsäure, die nicht durch eine Protonierung kompliziert ist, findet man einen Anstieg von K_m nach der alkalischen Seite, der - unter Vorbehalt - der Beteiligung einer Gruppe mit einem pK-Wert von 6,6-8 entspricht. Für k_{+2} findet man einen Anstieg der einem pK-Wert von 5,8 entspricht. Die Kurve erreicht ein Maximum bei pH 6,7 und fällt auf der alkalischen Seite wieder ab. Der Abfall auf der alkalischen Seite kann nach den Erfahrungen bei der Pankreas-Ribonuclease auf einer Umlagerung in eine inaktive Form beruhen und soll deshalb noch nicht als Merkmal für eine ionisierende Gruppe mit

einem höheren pK-Wert im Enzym-Substratkomplex interpretiert werden.

Aus den zuvor erhaltenen Anhaltspunkten ergibt sich, daß die Nucleobase nicht in die Reaktion eingreifen kann. Es folgt daraus, daß die Aktivierung des Wassers durch eine Base am Enzym erfolgen muß. Dann kann aber die Bindung nur über die Phosphatgruppe hergestellt werden. Dadurch ist zunächst noch mit Vorbehalt der Anstieg von K_m nach der alkalischen Seite hin allein auf die Deprotonierung einer Säure mit dem pK von 6,6 - 6,8 zurückzuführen. Als Partner der Phosphatgruppe kommt praktisch nur eine Kationsäure in Frage und nach der Lage des pK-Wertes eigentlich nur ein Histidinium. Ebenfalls ein starker Hinweis auf die Beteiligung eines Histidins ist die von Sato et.al.⁴⁶ beobachtete Inaktivierung des Enzyms durch Photooxidation.

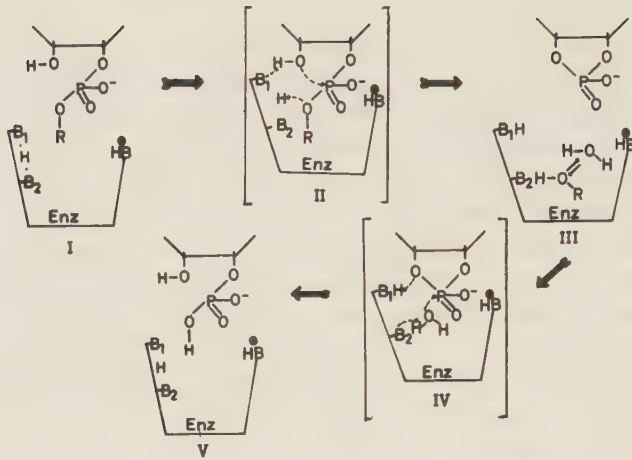
Wenn die Aktivierung des Wassers durch eine Base des Enzyms geschieht, dann weist der pK-Wert von 5,8 wiederum auf ein Histidin hin. Dies gilt jedoch nur unter dem Vorbehalt, daß der Angriff des Wassers der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in k_{+2} wäre und nicht etwa die folgende Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes unter Mitwirkung einer solchen Base.

Für die Berechtigung dieser Annahme spricht, daß K_m für das monoanionische Substrat wie auch das K_1 für den dianionischen und den monoanionischen Inhibitor 2'-Cytidylsäure-methylester praktisch gleich sind. Wenn k_{+1} mit etwa $10^7 \text{ Mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ angenommen wird, bleibt bei $K_m = 10^{-4}$ für $k_{-1} + k_{+2}$ ein Wert von etwa 10^3 . Für k_{+2} wurde etwa 30 sec^{-1} gemessen. K_m darf deshalb hier als $K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$ behandelt werden mit k_{+2} vernachlässigbar klein gegen k_{-1} .

Ein Additionsmechanismus mit fünfbindigem Phosphor ist nur bei zweifacher Protonierung der Phosphatgruppe denkbar. Da hier jedoch durch Hemmversuche nur eine einfache Protonierung der Phosphatgruppe durch das Enzym nachgewiesen wurde, die im wesentlichen zur Bindung beiträgt, kommt ein Additionsmechanismus nicht in Frage, sondern es ist ein Mechanismus nach dem S_N2 -Typ zu formulieren, das heißt mit dem Eintritt eines Nucleophils muß ein Nucleophil austreten. Ein enzymstabilisierter Zwischenzustand mit fünfbindigem Phosphor wie bei der Pankreas-Ribonuclease tritt hierbei nicht ein.

Für den S_N2 -Typ-Mechanismus ist zu beachten, daß das Wasser nicht von einer beliebigen Seite aus eintreten kann, da nur der 3'-Monoester gebildet wird. Das Wasser muß entweder auf der Gegenseite der 2'-Bindung eintreten können, oder es findet eine zusätzliche Säurekatalyse am 2'-Sauerstoff statt, die von der conjugaten Säure einer zweiten Base durchgeführt werden muß. Für die letztere Annahme spricht, daß bei der Umesterung im ersten Schritt nicht das Wasser, sondern die 2'-OH-Gruppe aktiviert wird. Hier muß eine Base das Proton dieser Gruppe übernehmen. Sie sollte dann auch in der Lage sein, als conjugate Säure ein Proton auf den gleichen Sauerstoff zu übertragen. Diese Forderung ergibt sich aus der Reversibilität der Reaktion. Da sich aus den cyclischen Nucleotiden auch wieder 3',5'-Diester zurückbilden, wenn man Nucleosid im Überschuß hinzugibt, muß der Eintritt des Nucleosids in der gleichen Weise erfolgen, wie der vorhergehende Austritt, das heißt mit einem Proton, das einmal zum Alkohol gehörend und einmal zur Base gehörend betrachtet werden kann. Dasselbe gilt aber auch für den ein- und austretenden 2'-Sauerstoff.

Daraus würde folgen, daß zwei Basen existieren müssen, von denen im ersten Schritt der Reaktion die eine die 2'-OH-Gruppe als Base (B_1) aktiviert, während die andere als conjugate Säure (HB_2) den Sauerstoff der 5'-Esterbindung angreift. Im zweiten Schritt der Reaktion würde jedoch die erste Base in Form der conjugaten Säure (HB_1) das Proton auf den 2'-Sauerstoff übertragen, während die andere als Base (B_2) das Wassermolekül aktiviert. Es läßt sich dann folgender Mechanismus formulieren, der zu berücksichtigen hat, daß Säure und Base fixiert sein müssen, um gleichzeitig wirken zu können.



Dieser zunächst aus vielfältigen Anhaltspunkten formulierte Mechanismus hat mehrere Konsequenzen, die an Hand der vorliegenden Ergebnisse überprüfbar sind.

- 1) Im ersten Schritt greift B_1 an der 2'-OH-Gruppe an, HB_2 am 5'-Sauerstoff des Substrats. Im zweiten Schritt aktiviert B_2 das nicht zum Substrat gehörende Wassermolekül und nur HB_1 greift am 2'-Sauerstoff des Substrats an. K_m sollte deshalb im ersten Schritt kleiner sein als im zweiten Schritt, wenn k_{-1} gegenüber k_{+2} führend ist.
- 2) Die Basenkatalyse wird an der 2'-OH-Gruppe von der Enzybase B_1 durchgeführt, am Wassermolekül jedoch von der Enzybase B_2 . Differieren die beiden Basen in ihrem pK-Wert, dann sollten zwei verschiedene pH-Abhängigkeitskurven für die k_{+2} -Werte der beiden Schritte resultieren.
- 3) Unterschiede in der pH-Abhängigkeit von K_m und K_i sollten dann zu erkennen geben, ob und wie weit im K_m -Wert k_{+2} eine Rolle spielt. Dadurch wäre es möglich, die Kurve von k_{+2}/K_m (Abb.29)

zu interpretieren, die bei diesem Mechanismus nicht mit der k_{+1} -Kurve gleichzusetzen ist wie bei der Pankreas-Ribonuclease, bei der die pH-Abhängigkeit für k_{+1} und k_{+2} als Alternativreaktion identisch ist.

Betrachten wir deshalb die Kinetik verschiedener Dinucleosidphosphate.

Das Diagramm für das Dinucleosidphosphat UpA und 2',3'-cyclische Uridylsäure (Abbildung 28) zeigt sowohl die Verschiebung der beiden Kurven als auch den wesentlich geringeren K_m -Wert für den ersten Schritt (I-III). Die Geschwindigkeit der Überalles-Reaktion ist durch diese Verschiebung für UpA bei pH 4,5 etwa 10 mal höher, bei pH 6,7 jedoch nur noch 1,5 mal höher als bei der cyclischen Uridylsäure.

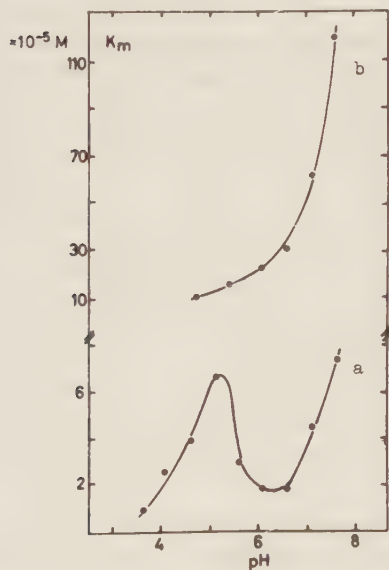


Abb. 28
pH-Abhängigkeit von K_m bei
der Spaltung von: a) UpA,
b) Up(c), DMGS/NaOH
I = 0,2

Aus der Verschiebung kann nun abgeleitet werden, daß Enzymbase B_1 eine Base sein muß mit einem pK-Wert von etwa 4,2 - vielleicht die Carboxylatgruppe einer Glutaminsäure. Die Inaktivierung des Enzyms durch Carboxymethylierung ⁴⁶ bekräftigt diese Vermutung.

Enzymbase B_2 würde bei einer Deprotonierung die Fähigkeit zur Protonenkatalyse am 5'-Sauerstoff verlieren und dadurch den Abfall von k_{+2} verursachen. Der pK-Wert, der sich aus dem Abfall der Geschwindigkeit ergibt, liegt bei 5,8. Diese Base ist die gleiche, die im zweiten Schritt, jetzt als Base, das Wasser aktiviert, also den Anstieg von k_{+2} verursacht. Hierfür hatten wir bereits den gleichen pK-Wert von etwa 5,8 gefunden, der einem Histidin zugeordnet werden muß.

Es fällt auf, daß der K_m -Wert jetzt im Bereich von pH 3,5 - 6,5 praktisch mit dem k_{+2} -Wert parallel läuft. Offensichtlich liegt der Betrag von k_{+2} jetzt in der gleichen Größenordnung wie der Betrag von k_{-1} , sodaß sich im K_m -Wert, dem weitgehend pH-konstanten Anteil von k_{-1} , die Variation des Betrages von k_{+2} mit dem pH-Wert überlagert. Eine einfache Rechnung zeigt die Berechtigung dieser Annahme: Bleibt k_{+1} unterhalb pH 6 konstant bei $10^7 \text{ sec}^{-1} \text{ M}$, dann käme bei einem K_m von 10^{-5} M auf den Ausdruck $k_{-1} + k_{+2}$ etwa $10^2/\text{sec}^{-1}$, der in der Größenordnung des gefundenen k_{+2} -Wertes liegt.

Das würde heißen, daß $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ von der alkalischen Seite

herkommend zunächst abfällt, da k_{+1} sich im Nenner bis zu einem pH von etwa 6,5 vergrößert. Dann steigt K_m wieder durch eine Vergrößerung von k_{+2} an und fällt wieder mit der Abnahme von k_{+2} . In diesem Bereich sollten k_{-1} und k_{+1} praktisch konstant bleiben.

Dieser Wechsel in der Führung von Seiten des Wertes für k_{+1} und k_{+2} geht auch aus der k_{+2}/K_m -Kurve hervor, die keiner einfachen Funktion entspricht mit einer oder zwei ionisierenden Gruppen. Es wäre dann eine Titrationskurve oder eine Glockenkurve zu erwarten gewesen.

Man könnte vielleicht den Einfluß von k_{+2} eliminieren, wenn man die pH-Abhängigkeit von K_1 , das praktisch k_{-1}/k_{+1} ist, verfolgen würde. Diese Messungen sind noch nicht durchgeführt worden.

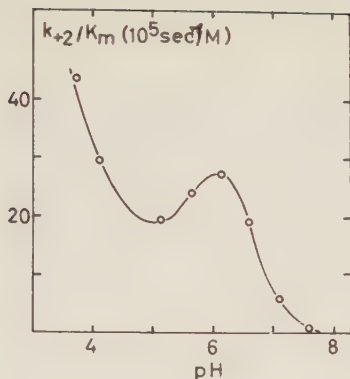


Abb. 29

k_{+2}/K_m für UpA in Abhängigkeit vom pH-Wert

Fast gleiche Verhältnisse findet man beim Vergleich von CpC und cyclischer Cytidylsäure. Beide liegen in ihren k_{+2} - und auch K_m -Werten niedriger als die entsprechenden Uridylsäure-Verbindungen. Auffallend ist auch, daß bei der 2',3'-cyclischen Cytidylsäure eine kleine Erhöhung bei pH 5 auftritt.

Unter den gemessenen Dinucleosidphosphaten weisen ApA, ApC, ApU, CpC, CpA, UpA, GpU und IpU das gleiche Profil auf mit in der gleichen Reihenfolge zunehmenden k_{+2} und K_m -Werten.

Die relativ hohe Spaltungsgeschwindigkeit des 3'-Up- γ -naphthylesters erklärt sich aus der erhöhten Elektrophilie am Phosphor. Uridin-2',3'-cyclo-phosphorthionat wird wegen der herabgesetzten Elektrophilie am Phosphor etwa 8 - 10 mal langsamer als die vergleichbare cyclische Uridylsäure hydrolysiert.

Das Isomerenpaar GpA und ApG fällt völlig heraus. K_m und k_{+2} sind bei pH 5 am niedrigsten und bei pH 6,5 am höchsten, ähnlich den Kurven für die cyclischen Nucleotide. Die Gründe hierfür sind noch nicht bekannt und erfordern weitere Untersuchungen.

2. Zum Katalyseprinzip der Ribonuclease T_2 und Ribonuclease T_1

Vergleicht man das Prinzip der Spaltung der Ribonuclease T_2 mit dem Prinzip der Spaltung der Ribonuclease T_1 , wie es sich aus der

Arbeit von Pongs⁶¹ ergibt, so erkennt man, daß beide Enzyme an der 2'-OH-Gruppe beziehungsweise am Sauerstoff, der die Phosphatgruppe verläßt, mit einem korrespondierenden Säure-Base-System ($B \rightleftharpoons H \rightleftharpoons B$) angreifen.

Die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Reaktion ist relativ gering, wenn nicht eine zusätzliche Bindung der Substrate erfolgt, welche die Verweilzeit im katalytischen Zentrum wesentlich erhöht. Bei der Ribonuclease T_1 wird dies, wie Pongs^{14,15} zeigen konnte, durch eine zusätzliche Bindung der Carbamidstruktur in 1,6-Stellung, von Purinbasen erreicht.

Bei der Ribonuclease T_2 wird die zusätzliche Bindung durch eine positiv geladene Gruppe hergestellt, die sich an Hand der kinetischen Untersuchungen als Imidazolium erweist. Das $B \rightleftharpoons H \rightleftharpoons B$ -System selbst scheint aus einem Imidazolium gebunden an ein Carboxylatanion zu bestehen.

Es ist auffällig, daß in einem Organismus zwei Enzyme gefunden werden, die nach dem gleichen Prinzip spalten und nur in der Art der bindenden Hilfsgruppen differieren. Es erhebt sich die Frage, ob das eine Enzym (RNase T_1), das nur ein Molekulargewicht von 11127 hat, ein Abkömmling von der Ribonuclease T_2 ist, die ein Molekulargewicht von 36700 besitzt. Die Aminosäurezusammensetzung schließt dies nicht aus, da alle in der Ribonuclease T_1 vorkommenden Aminosäuren mindestens in der gleichen Anzahl auch in der Ribonuclease T_2 vorkommen. Während die Aminosäuresequenz der Ribonuclease T_2 noch nicht bekannt ist, wurde sie für die Ribonuclease T_1 von Takahashi¹² aufgeklärt.

Eine Verwandtschaft der beiden Ribonucleasen könnte, obwohl rein äußerlich die Enzyme eine völlig andere Spezifität aufweisen, beim Vorliegen einer ähnlichen Aminosäuresequenz erst durch die Identität des Katalyseprinzips nachgewiesen werden. Es würde sich ein Zugang zur Evolution von katalytischen Zentren eröffnen.

E. Zusammenfassung

Die Ribonuclease T_2 , welche die 3',5'-Phosphodiesterbindung der Ribonucleinsäure spaltet, läßt sich aus Luizym-Sirup, einem Extrakt aus *Aspergillus oryzae*, durch Gelfiltration, saure Denaturierung von Begleitproteinen und Ionenaustauschchromatographie an Sephadex DEAE-A50 780 fach anreichern.

Nach der Sedimentation in der Ultrazentrifuge und der elektrophoretischen Beweglichkeit in der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese erscheint das Enzym, wie auch die nach der Isolierung nicht weiter untersuchte Ribonuclease T_1 , einheitlich.

Zur Aufklärung der Substratspezifität wurden eine Reihe Modell-ester untersucht, von denen der 2',3'-cyclische Phosphodiester des Benzimidazolribofuranosids und des Benzylribofuranosids erstmals synthetisiert wurden.

Die Versuche zu einer qualitativen Abgrenzung der Erfordernisse für eine Reaktion lassen keine spezifischen Gruppierungen bezüglich der glycosidischen Komponente erkennen. Dennoch bleibt die Glycosidkomponente nicht ganz ohne Einfluß. Die Hydrolysegeschwindigkeit wird langsamer, je weniger das Ringsystem hydratisierbar ist. So wird der 2',3'-cyclische Phosphodiester des Benzylribofuranosids nur mit sehr hoher Enzymkonzentration ($10^{-5}M$) gespalten. Der 2',3'-cyclische Phosphodiester des Methylribofuranosids wird nicht mehr hydrolysiert.

Es wird die Möglichkeit eines induktiven Effekts diskutiert, der sich von der Nucleobase her auf den 2'-Sauerstoff auswirkt. Eine Parallelität zwischen den Geschwindigkeiten und den pK-Werten der Nucleoside fällt auf. Der Unterschied zwischen Benzyl- und Methylglycosid, wie auch die Beobachtung, daß die an der Nucleobase methylierten cyclischen Nucleotide langsamer hydrolysiert werden als die entsprechenden nichtmethylierten Verbindungen paßt in diese Vorstellung.

Die kinetischen Messungen ergeben bei der Hydrolyse der 2',3'-cyclischen Phosphodiester für die kinetischen Parameter ein anderes pH-Profil als für die Spaltung der 3',5'-Internucleotid-

bindung der Dinucleosidphosphate. Die Konstante K_m ist für die Dinucleosidphosphate durchschnittlich eine Zehnerpotenz kleiner als für die 2',3'-cyclischen Diester.

Erste Untersuchungen über den Einfluß von Modifizierern auf die Hydrolysegeschwindigkeit zeigen, daß Nucleobase und Nucleosid ohne Einfluß bleiben, während 2'-Nucleotide stark hemmen.

Für beteiligte Gruppen von Seiten des Enzyms werden die drei pK-Werte 4,2, 5,8 und 6,8 - 7,2 abgeleitet.

Es wird ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem ein conjugates Säure-Basen-Paar für die Aktivierung der 2'-OH-Gruppe im ersten Schritt und die Aktivierung des Wassers im zweiten Schritt verantwortlich ist. Während die 2'-OH-Gruppe von der Base B_1 aktiviert wird, greift die conjugate Säure HB_2 den Sauerstoff der 5'-Diesterbindung an. Im zweiten Schritt der Reaktion überträgt die erste Base als conjugate Säure (HB_1) das Proton auf den 2'-Sauerstoff, während die Base B_2 das Wassermolekül aktiviert.

F. Experimenteller Teil

I. Isolierung der Ribonuclease T₂ und Ribonuclease T₁

1. Gelfiltration an Sephadex G 75

20 ml Luizym-Sirup ^{*)} werden mit 20 ml 0,1 N Natriumbicarbonat verdünnt. Durch Gelfiltration über eine nach den Vorschriften des Herstellers ^{**)} mit Sephadex G 75 bereitete Säule wird von größeren Mengen inaktiver Proteine und niedermolekularer Begleitstoffe abgetrennt. Die Daten dieses säulenchromatographischen Schrittes sind: Säule: 7 x 140 cm, Gelbett: 300 g Sephadex G 75, Puffer: 0,1 N NaHCO₃, Elutionsgeschwindigkeit: 80 - 100 ml/Std., Elutionsdauer: 24 Stunden, Fraktionen: 4/Std.

Der Auslauf wird über einen Uvikord ^{***)} geleitet, der die Transmission bei 253,7 nm registriert. Das Eluat wird in 20 - 25 ml pro Fraktion getrennt. Elutionsverlauf siehe Abbildung 1. Die Fraktionen werden nach F. II. 2. getestet und die aktiven Fraktionen vereinigt. Die RNase-T₂ erscheint im zweiten Gipfel. Nach etwas Erfahrung sammelt man die aktiven Fraktionen, ohne die Lösungen zu testen. Nach einem Absorptionsminimum erscheint ein hoher Gipfel, der den braunen Farbstoff, Zucker und andere niedermolekulare Begleitstoffe enthält. Mit dem Anfangsteil dieses Gipfels wird die RNase T₁ eluiert, deren Aktivität nach F.II.3. getestet wird.

Beide getrennt gesammelten Ribonuclease-Fraktionen werden durch Zugabe von Kationenaustauscher (Dowex 50 W x 8 in H⁺-Form) entsalzt. Nach etwa 15 Minuten sollte der pH-Wert zwischen pH 4 und 5 liegen. Es wird vom Austauscher abfiltriert und gefriergetrocknet

^{*)} Luitpold-Werke, München

^{**)} Pharmacia, Schweden

^{***)} LKB, Schweden

2. Säurefällung

Nach diesem Gelfiltrationsschritt sind sowohl in der RNase T_2 -aktiven Fraktion als auch in der RNase T_1 -aktiven Fraktion noch eine Anzahl anderer Enzyme enthalten, die im nächsten Schritt durch Säurefällung denaturiert und ausgeflockt werden. Für diese Operation wird das Produkt aus mehreren Ansätzen vereinigt. Das Enzympulver wird in einem Zentrifugenglas in wenig Wasser (ca. 10 ml/g Protein) gelöst. Im Eisbad wird tropfenweise eisgekühlte 2N H_2SO_4 (2N HCl) zugesetzt, bis die Lösung einen pH-Wert von 1,6 - 1,8 erreicht hat. Der Niederschlag wird bei 3000 Umdrehungen/Min. abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird mit 2N NH_3 neutralisiert und erneut auf eine Säule mit Sephadex G 75 gesetzt, die jetzt nur mit Wasser vorbereitet ist. Beim Durchwaschen mit Wasser werden drei Gipfel eluiert, von denen der zuerst eluierte Gipfel ein hochmolekularer Eiweißkörper ist. Nach dem zweiten Gipfel, der die RNase T_2 -Aktivität enthält, wird ein dritter brauner, niedermolekularer Gipfel eluiert. Bei der RNase T_1 -Präparation erscheint der Aktivitätsgipfel wieder im aufsteigenden Ast des Farbstoffpeaks. Die Fraktionen werden nach F.II.2. bzw. II. 3. getestet. Säule: 3 x 140 cm, Gelbett: Sephadex G 75, Puffer: H_2O dest., Elutionsgeschwindigkeit: 50 ml/Std., Elutionsdauer: 24 Stunden, Fraktionen: 2/Std.

3. Anionenaustausch an Sephadex DEAE-A 50

Zur Vorbereitung der Säule läßt man das Sephadex-Pulver über Nacht in ausreichend Wasser (15 ml/g Trockengewicht) quellen. Auf einem Büchner-Trichter wird abgesaugt und anschließend in einem geeigneten Gefäß zuerst mit 0,5 N Salzsäure gerührt. Nach 30 Minuten wird abgesaugt, mit Wasser neutralgewaschen und mit 0,5 N NaOH ebenfalls 30 Minuten gerührt. Nach Absaugen und Neutralwaschen wird mit dem für den anschließenden Versuch vorgesehenen Puffer äquilibriert. Die Fraktionen mit RNase T_2 -Aktivität (aus I.2) werden vereinigt (RNase T_1 entsprechend). Die Lösung durch Zugabe von festem $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ auf eine Ionenkon-

zentration von 0,005 M gebracht. Es wird nun die mit 0,005 M Na_2HPO_4 -Puffer vorbereitete Sephadex DEAE-Anionenaustauschersäule beschickt. Nach der Adsorption wird mit einem pH- und Salzgradienten eluiert. Die Elution beginnt mit 0,005 M Na_2HPO_4 -Puffer pH 8,2, der sich in dem dicht verschlossenen Mischgefäß befindet, das über einen Schlauch zur Säule führt. Aus einem offenen Vorratsgefäß fließt Endpuffer in das Mischgefäß nach. Säule: 1,2 x 30 cm, Mischgefäß: 0,5 l 0,005 M Na_2HPO_4 , pH 8,2, Vorratsgefäß: 1,0 l 0,25 M NaH_2PO_4 + 0,25 M NaCl, pH 4,1, Elutionsgeschwindigkeit: 60 ml/Std., Elutionsdauer: 10 Stunden, Fraktionen: 6/Std. Das Eluat wird nach II.2 und II.3 getestet und die aktiven Fraktionen vereinigt. Am Rotationsverdampfer (Wasserbad 40°C) wird auf 15 - 20 % des Volumens ohne Aktivitätsverlust eingeeengt. Anschließend wird sofort über eine weitere Sephadex G 75-Säule fraktioniert und entsalzt (Säule wie unter I.2.), und ein zweites Mal über Sephadex DEAE-A 50 chromatographiert (wie I.3.).

Die spezifische Aktivität der Ribonuclease T_2 konnte durch einen weiteren chromatographischen Schritt nicht mehr erhöht werden. Nach erneuter Entsalzung über Sephadex G 75 wurde die Enzympräparation gefriergetrocknet und im Eisschrank für die weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

II. Bestimmung der Enzymaktivitäten

1. Gesamt-Ribonucleasenaktivität ¹⁶

- a) RNS-Lösung: 12 mg RNS/ml Puffer
5 mM EDTA
0,2 M Natriumacetat-Puffer pH 4,5 (RNase T_2)
0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (RNase T_1)

Käufliche RNS wird vorher über eine mit Sephadex G 25 gefüllte Säule von säurelöslichen (niedermolekularen) Fraktionen befreit.

- b) 0,75 % Uranylacetat in 25 %iger Perchlorsäure

Test: Zu 0,6 ml der RNS-Lösung werden in einem Zentrifugenglas 0,1 ml der Enzymlösung (in entsprechender Verdünnung) gegeben

und genau 15 Minuten im Thermostaten bei 37°C gehalten. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 0,3 ml der Uranylacetat-Lösung gestoppt. Nach 2 Minuten im Eisbad wird der Niederschlag abzentrifugiert. Vom Überstand werden 0,1 ml mit 2,5 ml Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm gegen einen Blindwert gemessen, dem die Enzymlösung erst nach Zugabe der Uranylacetat-Lösung zugesetzt wird.

Eine Extinktion von 1,0 unter diesen Bedingungen wird als eine Enzymeinheit definiert. Die Proteinkonzentration in der Enzymlösung wird durch Messen der Extinktion bei 280 nm ermittelt. Eine Extinktion von 1,0 entspricht nach üblicher Annahme ¹⁷ 1 mg Protein pro ml Lösung. Die spezifische Aktivität errechnet sich aus dem Quotienten der Enzymeinheiten und der Proteinkonzentration (spez. Akt. = $\frac{\text{Einheiten}}{\text{mg Protein}}$). Der beschriebene Test kann für alle Isolierungsschritte der Ribonucleasen T₁ und T₂ angewendet werden.

Eine schnellere Bestimmung läßt sich mit einem registrierenden Spektralphotometer durchführen, wie in II.2. beschrieben.

2. Ribonuclease T₂ - Aktivität

- a) Puffer: β , β -Dimethylglutarsäure/NaOH I = 0,2, pH 6,0
- b) Substrat: 1 μ Mol Cytidin-2',3'-cyclo-phosphat
(Uridin - 2',3'-cyclo-phosphat)
pro ml Pufferlösung

Test: Es wird der Absorptionsunterschied der 2',3'-cyclischen Pyrimidinnucleotide als Substrat und der 3'-Pyrimidinnucleotide als Produkt zwischen 275 nm - 300 nm ausgenutzt. Diese Messungen wurden mit dem Cary 15 registriert.

1 ml einer millimolaren Substratlösung wird in eine Halbmikro-Küvette gefüllt. Als Vergleichslösung dient Puffer in einer zweiten Küvette. Es wird die Wellenlänge eingestellt, bei der die Substratlösung etwa eine Extinktion von 1,1 besitzt (das ist für Up(c) bei 282 nm, für Cp(c) bei 291 nm). Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 - 50 μ l der Enzymlösung zur Substratlösung mittels einer Mikropipette bei 25°C gestartet. Zur besseren Durchmischung

werden einige Luftblasen durch die Lösung geblasen.

Im Verlauf der Reaktion steigt die Extinktion um einen Faktor von 1,6 für Cp(c) und 1,8 für Up(c), der bei jeder Serie neu zu bestimmen ist. Die Gesamtänderung der Extinktion entspricht dem Umsatz von 1 μMol . Als eine Enzymeinheit wird die Spaltung von 1 μMol 2',3'-cyclischem Nucleotid in der ersten Minute definiert. Da die Hydrolysegeschwindigkeiten für verschiedene Substrate etwas variiert, wurde Cp(c) als Bezugssubstrat gewählt.

Die durch Hydrolyse von Up(c) ermittelten Enzymeinheiten verhalten sich zu denen durch Cp(c)-Spaltung erhaltenen Einheiten etwa wie 2:1.

3. Ribonuclease T_1 -Aktivität

a) Puffer: wie II.2., pH 7,5

b) Substrat: 0,1 μMol GpC pro ml Pufferlösung

Test: Es wird wie unter II.2. mit folgenden Abweichungen verfahren. Die Substratlösung soll im Maximum des UV-Spektrums (255 nm) eine Extinktion von 1,7 haben (0,1 $\mu\text{Mol/ml}$). Es wird der Hypochromieeffekt im Maximum ausgenutzt. Bei der Phosphodiestererspaltung steigt die Extinktion um einen Faktor 1,06 und zeigt den Umsatz von 0,1 μMol GpC an. Eine Einheit ist die Enzymmenge, die 0,1 μMol GpC in der ersten Minute spalten würde.

III. Bestimmung der Phosphatasenaktivität

1. Saure Phosphatase *)

Substratlösung: 5,5 mM p-Nitrophenylphosphat
in 0,05 M Citratpuffer pH 4,8

Test: Zu 0,5 ml der Substratlösung werden 0,1 ml der Enzymlösung pipettiert. Nach 18 Stunden bei 37°C werden 5 ml 0,05 N Natron-

*) Farb-Test der Boehringer und Söhne GmbH., Mannheim (abgeändert)

lauge zugesetzt. Die Extinktion wird bei 405 nm gegen einen Blindwert bestimmt, dem die Enzymlösung erst nach der Natronlaugezugabe zugesetzt wird.

2. Phosphodiesterasen 21,22

Substratlösung: 1,1 mM Di-p-nitrophenylphosphat in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,6

Test: Zu 0,9 ml der Substratlösung werden 0,1 ml der Enzymlösung pipettiert und 18 Stunden bei 37°C gehalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml 0,05 N Natronlauge gestoppt. Die Extinktion wird bei 405 nm gegen einen Blindwert gemessen, dem 0,1 ml Enzymlösung erst nach der Natronlaugezugabe zugesetzt wird.

IV. Kinetische Messungen

1. Spektralphotometrische Methode für die cyclischen Pyrimidin-nucleotide

Bei den meisten cyclischen Pyrimidinnucleotiden unterscheiden sich die Spektren von Substrat und entstehendem Produkt. Die Reaktion läßt sich dann spektralphotometrisch verfolgen.

Diese Unterschiede wurden mit einem Cary 15 registriert. In Vergleichs- und Probe-Küvette wird genau 1,0 ml Puffer gefüllt. Aus einer Mikrometerspritze wird das Substrat zugegeben, wobei die Konzentration aus der Extinktion der verwendeten Substratlösung und ihrer Menge berechnet wird. Eine gute Mischung wird durch Einblasen von Luft erzielt.

Mit einer mm³-Pipette wird die Enzymlösung (Enzym in 0,2 M NaCl gelöst) in die Küvette bei laufender Registrierung eingeführt und durch Einblasen von Luft gemischt. Die zeitliche Veränderung der Extinktion wird registriert. Ändert sich die Extinktion im Verlaufe von 10 Minuten nicht mehr, so ist der Endpunkt (Endwert) der Reaktion erreicht, der für die Auswertung unbedingt benötigt wird.

2. Spektralphotometrische Methode für die Dinucleosidphosphate durch Ausnutzung des hypochromen Effekts.

Dinucleosidphosphate zeigen eine geringere molare Extinktion als aus der Summe der Extinktionen von Nucleotid und Nucleosid zu erwarten ist. Dieser hypochrome Effekt wurde bei der Verfolgung der Hydrolysegeschwindigkeit der Dinucleosidphosphate ausgenutzt. Die Durchführung der kinetischen Messungen geschieht wie unter IV.1.

3. Auswertung der kinetischen Messungen

Hierzu wird die Differenz zwischen der momentanen Extinktion und dem Endwert in Abständen von 30 sec. aus der Reaktionskurve entnommen und der Logarithmus dieser Differenz gegen die Zeit aufgetragen. Diese Meßpunkte liefern eine Gerade, deren Steigung ($\text{tg}\alpha$) dem Diagramm entnommen wird.

Für alle eingesetzten Substratkonzentrationen wird die zugehörige Reaktionsgeschwindigkeit berechnet nach

$$v = 2,303 \cdot s \cdot \text{tg}\alpha \quad (\text{Mol/Liter} \cdot \text{min})$$

Aus den so ermittelten v -Werten lassen sich die Lineweaver-Burk-Diagramme zusammenstellen, aus denen die kinetischen Konstanten entnommen werden. Aus dem Schnittpunkt mit der e/v -Achse errechnet sich k_{+2} , aus dem Schnittpunkt mit der $1/s$ -Achse K_m .

4. Pufferlösungen

Für die Messungen wurden folgende Pufferlösungen verwendet

a) β, β -Dimethylglutarsäure/NaOH	pH 3,7 - 7,6	I = 0,1
b) β, β -Dimethylglutarsäure/Tris	pH 6,6 - 7,8	I = 0,1
c) Tris/HCl	pH 7,0 - 7,8	I = 0,1
d) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$	pH 7,0 - 7,8	I = 0,1
e) $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$	pH 3,7 - 5,5	I = 0,1

Alle Pufferlösungen wurden mit NaCl auf eine Ionenstärke $I' = 0,2$ eingestellt.

V. Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Papierchromatographie

Chromatographiert wurde absteigend auf Papier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043b.

Als Fließmittel wurden verwendet:

- a) Isopropanol: Wasser: Ammoniak (konz.) = 7:2:0,3 v/v
- b) Isopropanol: Wasser: Ammoniak (2N) = 7:2:1 v/v
- c) Isopropanol: Wasser = 7:3 v/v
- d) Isopropanol: Natriumacetat (1M):Ammoniumsulfat(ges.)=2:18:80^{v/v}

2. Papierelektrophorese ⁵²

a) Elektrophorese pH 9,25

Puffer: $H_3BO_3/NaOH$

Spannung: 1500 V

Stromstärke: 10 - 20 mA

Papier: Schleicher und Schüll 2043a

Laufzeit: 2 Stunden

b) Elektrophorese pH 3,5

Puffer: CH_3COOLi/CH_3COOH

Spannung: 300 - 400 V

Stromstärke: 3 - 5 mA

Papier: Schleicher und Schüll 2043b

Laufzeit: 10 - 14 Stunden

3. Reinigung der Substanzen

a) Papierchromatographische Reinigung

Kleinere Mengen an Reaktionsgemischen (bis 200 mg) wurden auf Karton (Schleicher und Schüll) aufgetragen und absteigend chromatographiert. Die einzelnen Bänder wurden im UV-Licht markiert,

ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Lösungen wurden entweder gefriergetrocknet oder am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

b) Ionenaustauschchromatographie

Bei Reaktionsgemischen über 200 mg wurden Dowex 1 x 2 Anionenaustauschersäulen (in Formiatform) beschickt. Die Elution wurde entweder mit einem Ameisensäuregradienten oder steigender Ammoniumformiatkonzentration durchgeführt. Die Substanzlösungen wurden vor Gefriertrocknung durch Messen der Extinktion bei 280 nm und 260 nm identifiziert.

4. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Cary 15 aufgenommen. Die zur Konzentrationsbestimmung herangezogenen Extinktionswerte entstammen der Literatur ^{33,56,57,58}.

5. Markierung der Substanzen

a) Ribonucleoside (1,2 cis-Glykol-Struktur)

Das Papierchromatogramm wird zuerst mit einer Lösung von 0,3 % Bleitetraacetat in wasserfreiem Eisessig und anschließend mit 3 % Benzidin in Eisessig besprüht. Die Nucleoside erscheinen als weiße Flecke auf blauem Grund.

b) Nucleotide (P-Bestimmung)

Sprühreagenz: 5 ml 60% HClO_4 , 10 ml 1N HCl

25 ml 4% $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt

Das Chromatogramm wird eingesprüht, ca. 7 Minuten bei 90°C getrocknet. Bei Belichtung mit der UV-Lampe (auch Sonnenlicht) erscheinen phosphorhaltige Verbindungen als blaue Flecken.

VI. Darstellung der Substrate

1. Dinucleosidphosphate

Die verwendeten Dinucleosidphosphate sind nach dem Verfahren von

Dimroth und Witzel ⁴⁹ durch Hydrolyse von Ribonucleinsäure mit Wismuthydroxid gewonnen.

2. Darstellung der cyclischen 2',3'-Phosphodiester

10 m Mol des Nucleotids werden in 25 ml $2n \text{ NH}_3$ und 50 ml Dimethylformamid gelöst. Dazu wird eine Lösung von 50 m Mol Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) in 25 ml t-Butanol gegeben, und das Gemisch 2 Stunden am Rückfluß gekocht.

Nach Abdampfen des t-Butanol im Vakuum wird mit 200 ml Wasser verdünnt. Der ausgefallene Dicyclohexyl-Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat dreimal mit je 150 ml Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung wird zuerst am Rotationsverdampfer, dann am Ölpumpenvakuum abgedampft.

Der trockene, blasige Rückstand wird in wenig (30 ml) trockenem Methanol gelöst und mit 10 ml BaBr_2 in Methanol (1m Mol/ml) wird das Bariumsalz des cyclischen Nucleotids langsam gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird der Rückstand zweimal mit Methanol, zweimal mit Methanol/Äther (1:1) und zweimal mit Äther gewaschen. Im evakuierten Exsiccator wird über Phosphorpentoxid getrocknet. Zur Reinheitsprüfung eignet sich die Papierchromatographie. Ausbeute 60 - 90 % der Theorie.

3. Darstellung der 2',3'-cyclischen Phosphodiester mit wasserlöslichem Carbodiimid ⁵⁴

Kleine Mengen an Nucleotiden lassen sich vorteilhaft mit wasserlöslichen Carbodiimiden nach Naylor und Gilham ⁵⁴ cyclisieren. 0,1 m Mol des Nucleotids werden in 3 ml Wasser gelöst und der pH-Wert auf 5,8 gebracht. 0,5 m Mol 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid werden bei Raumtemperatur hinzugefügt. Der pH-Wert wird während der ersten Stunde durch gelegentliche Zugabe von 0,1 N HCl auf pH 5,8 gehalten. Nach 4 Stunden Reaktionszeit wird (nach V.l.b.) chromatographiert. Die Ausbeute an 2',3'-cyclischem-Nucleotid ist quantitativ.

4. 3-Methyluridin-2',3'-cyclo-phosphat

100 mg (0,3 mMol) 2', (3')-Uridylsäure werden in 5 ml Wasser gelöst und mit 2 N NH_3 auf pH 4-5 abgestumpft. Unter Eiskühlung wird mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert. Am Rotationsverdampfer wird abgedampft und der Rückstand in 2 ml 0,5 N HCl gelöst und 4 Stunden auf 60°C erwärmt. Die Lösung wird nach dem Erkalten mit 2N NH_3 neutralisiert und (nach VI.3.) cyclisiert. Ausbeute: 50 mg (48 % d. Th.)

Rf.-Werte: (Fließmittel: V.l.b.)

3-Methyluridin - 2',3'-cyclo-phosphat : 60

3-Methyluridin - 2', (3')-phosphat : 24

UV-Spektrum: 3-Methyluridin-2'(3')-phosphat $\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$;
 $\lambda_{\text{min}} = 235 \text{ nm}$.

5. Benzimidazol - Hg Cl ³⁷

5,8 g (0,05 Mol) Benzimidazol und 2 g (0,05 Mol) Natronlauge werden in 50 ml Wasser unter Zusatz von Äthanol gelöst. 13,5 g (0,05 Mol) Quecksilber - II - chlorid in 150 ml Äthanol gelöst werden unter Rühren zum Natriumsalz des Benzimidazols hinzuge tropft. Nach dem Erkalten wird der Niederschlag auf einer Fritte (G-3) abfiltriert und mit kaltem Wasser chloridfrei gewaschen. Danach wäscht man zuerst mit Äthanol, dann mit Äther und trocknet im Exsiccator. Ausbeute: 9,5 g (5) = 49 % d. Th.

6. Benzimidazol-1-β-D-ribofuranosid

1 m Mol (5) wird in siedendem Xylol mit 500 mg (1 mMol) 1-Chlor-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranose^{55,33,32} versetzt. Nach dem Abkühlen zentrifugiert man vom Quecksilberhalogenidniederschlag ab und gießt das Filtrat in das zehnfache Volumen Petroläther. Das ausgefallene Harz wird in Chloroform aufgenommen, mit 3%iger Kaliumjodidlösung und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in 100 ml bei 0°C mit Ammoniak gesättigtem Methanol aufgenommen und 18 Stunden bei 4°C im Kühl-

schränk stehen gelassen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgedampft und der entstandene Benzoesäuremethylester mit Wasser codestilliert. Der eingedampfte Rückstand läßt sich aus Wasser umkristallisieren.

Rf - Wert: 78 Fließmittel: V.l.b.

UV-Spektrum:	λ max (nm)	λ min (nm)
pH 1	274, 267, 261, 253	272, 264, 256, 226
pH 7	279, 272, 264, 244	276, 267, 261, 223

7. Benzimidazol-1- β -D-5'-O-p-methoxyphenyldiphenylchlormethyl-ribofuranosid

450 mg (1,8 mMol) Benzimidazolribofuranosid (6) und 540 mg (1,8mMol) p-Methoxyphenyldiphenylchlormethan läßt man über Nacht im Vakuum (0,2 Torr) über Phosphorpentoxid trocknen. Beide Ausgangsprodukte werden nach Smith et.al.³⁹ in 5 ml abs. Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur gehalten. Nach 48 Stunden wird die Lösung in 40 ml Eiswasser eingegossen und das ausgefallene Harz im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet³³. Das Rohprodukt wird danach sofort weiterverarbeitet.

8. Benzimidazol-1- β -D-ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

Das rohe tritylierte Benzimidazolribofuranosid (7) wird in 10 ml abs. Pyridin gelöst, mit 4 ml β -Cyanoäthylphosphatlösung^{33,38} (4 mMol in Pyridin) versetzt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Es wird noch dreimal mit je 20 ml abs. Pyridin codestilliert, um letzte Spuren Wasser zu entfernen. Der Rückstand wird in 30 ml abs. Pyridin gelöst, 1,5 g Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt und im verschlossenen Kolben 48 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe von 3 ml Wasser läßt man weitere 30 Minuten stehen und saugt vom Dicyclohexylharnstoff ab. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit Wasser pyridinfrei codestilliert. Den Rückstand läßt man in 80%iger Essigsäure bei Raumtemperatur 3 Stunden stehen. Anschließend wird mit Wasser essigsäurefrei destilliert. Der Rück-

stand wird mit 20 ml 3 N Ammoniak bei 55°C 3 Stunden lang erwärmt. Die ammoniakalische Lösung wird am Rotationsverdampfer eingengt und mit Wasser ammoniakfrei destilliert.

Ausbeute: 250 mg (71 % d. Th.)

Rf - Wert: 29 Fließmittel: V.l.b.

UV-Spektrum:	λ max (nm)	λ min(nm)
(siehe Abb. 10)		
pH 1	274, 267, 261, 253	272, 264, 256, 226
pH 7	279, 272, 264, 244	276, 267, 261, 223

9. Benzimidazol-1- β -D-ribofuranosyl-2',3'-cyclo-phosphat

Ansatz: 200 mg (0,6 mMol) 8 und 0,6 mMol DCC

Verfahren: VI 3

Ausbeute: Cyclisierung quantitativ

Rf-Wert: 73 Fließmittel: V.l.b.

10. 1-O-Benzyl- β -D-ribofuranosid 40,33,32

500 mg (1 mMol) 1-Chlor-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribose^{53,4,11} werden mit 220 mg Benzylalkohol 2 Stunden stehengelassen. Nach dem Animpfen fällt das 1-O-benzyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosid aus. Fp 86 - 87°C. Die Abspaltung der Schutzgruppen des Tribenzoylnucleosids geschieht durch Kochen am Rückfluß mit $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$ ^{5,14}.

Fp: 93,5 - 94,5 ; Rf-Wert: 82 Fließmittel: V.l.b

UV-Spektrum	λ max(nm)	λ min(nm)
pH 7	261,256,251	259, 252, 228

11. 1-O-Benzyl- β -D-ribofuranosyl-2',3'-cyclophosphat

100 mg (0,5 mMol) (10) werden zur Verätherung der 5'-Hydroxygruppe (nach VI.7.) mit p-Methoxyphenyldiphenylchlormethan umge-

setzt. Das tritylierte Benzylribofuranosid wird mit 2 ml β -Cyanoäthylphosphat (nach VI.8.) phosphoryliert und nach Abspaltung der Schutzgruppen nach VI. 3. cyclisiert.

Rf-Wert: 74

Fließmittel: V.l.b

UV-Spektrum (Abb. 11)

λ max (nm)

λ min (nm)

pH 7

257

228

12. 2', (3') - α -Cytidylsäure

2', (3')- α -Cytidylsäure wurde nach Gassen und Witzel ^{33,59} isoliert.

13. Versuch zur Darstellung von 1-O-Benzyl- β -D-ribofuranosyl-2' (3')-phosphat aus 1-O-Benzylribofuranosid nach einem Verfahren von Holy und Scheit ⁴¹.

120 mg (0,5 mMol) 1-O-Benzyl-ribofuranosid (10) wurden in 1,5 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und 0,5 ml Triäthylphosphit und 0,2 ml Salzsäure in Dimethylformamid zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 0,2 ml Triäthylamin zugesetzt und das Lösungsmittel an der Ölpumpe abgedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml 2 N Ammoniak gelöst und nach 2 Stunden die wässrige Lösung abgedampft. Der trockene Rückstand wurde in 1,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,8 ml Hexachloraceton unter Eiskühlung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Gemisch anschließend an einer Dowex 1 x 2 Säule getrennt. Es wurde ein Nucleotid isoliert, daß nach Naylor und Gilham ⁵⁴ (VI.3.) cyclisiert werden konnte, dessen Identifizierung jedoch nicht sicher gelang.

VII. Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese nach Davis ²⁰

1. Acrylamid polymerisiert unter Einfluß von Licht, Katalysatoren

(Ammoniumpersulfat, Riboflavin) und geeigneten Weichmachern (N-N'-N'-N'-Tetramethyläthylendiamin = TEMED) zu einem elastischen Gel. Vermischung mit N-N'-Methylenbisacrylamid bedingt eine zusätzliche Quervernetzung und Bildung eines engmaschigen Gels. Konzentration und Mischverhältnis beider Komponenten bestimmen die Porengröße. Das Gel zeichnet sich durch seine Unlöslichkeit in Wasser, seine Transparenz und seine hohe Stabilität gegen Temperatur- und pH-Änderungen aus.

Die Auftrennung von Substanzproben geschieht in Gelsäulen, die aus drei Abschnitten bestehen: Probengel, großporig (4%), pH 6,7; Sammelgel, großporig (4%), pH 6,7; Trenngel, kleinporig (6%), pH 8,9. Die beschickten Gelsäulen (5x0,5 cm) werden mit zwei übereinanderstehenden Pufferkammern verbunden (Anodengefäß unten). Nach der Trennung (4 mA/Säule, Laufzeit 35 - 40 Minuten) werden die Gelsäulen in Eiswasser gebracht (Diffusionshemmung) und das Gel mit einer Nadel vom Glaszylinder gelöst und in ein Färbebad von 1%iger Amidoschwarzlösung in 7%iger Essigsäure gebracht. Färbedauer 1 - 2 Stunden. Die Entfärbung erfolgt in weitleumigeren Glasröhren in 7%iger Essigsäure bei ca. 400 Volt (Dauer ca. 2 Stunden). Die Proteinbanden bleiben blau gefärbt. Die Säulen sind bei Raumtemperatur verschlossen in 7%iger Essigsäure lange haltbar.

Die Trennwirkung beruht auf Molekularsiebwirkung und gleichzeitig auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten der Moleküle im elektrischen Feld aufgrund ihres Ladungszustandes. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems in Verbindung mit Gelabschnitten verschiedener Porengröße bedingt vor dem Eintritt in das eigentliche Trenngel eine Konzentration des Materials auf eine schmale Startzone.

2. Herstellung der Gelsäulen

Die Polymerisation erfolgt in einseitig verschlossenen Glasröhrchen.

a) Einfüllen des Trenngels (5,1) Höhe 3,5 cm

Überschichten mit Wasser (Methylenblau-Zusatz)

Photopolymerisation (Fluoreszenzlampe), Dauer: ca. 40 Minuten
Danach Entfernen des Wassers.

- b) Einfüllen des Sammelgels (5,2), Höhe 0,5 cm
Überschichten und Polymerisation wie unter 2.a.
Dauer ca. 20 Minuten, Wasser entfernen.
- c) Einfüllen des Probengels (Mischung: Sammelgel/Probe)
Höhe 0,5 cm. Weitere Behandlung wie unter 2.a.
Anschließend Röhrchen mit Puffer auffüllen und mit den zwei
Pufferkammern verbinden. Anodengefäß unten.

3. Reagenzien

(1) Acrylamid, (2) N-N'-Methylenbisacrylamid (BIS), (3) Tris-
(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), (4) N-N'-N'-N'- Tetramethyl-
äthylendiamin (TEMED), (5) Riboflavin, (6) 1 N HCl, (7) Ammon-
persulfat, (8) Glykokoll (9) 7%ige Essigsäure, (10) Amido-Schwarz
10 B, (11) Bromphenolblau, (12) Methylenblau.

4. Stammlösungen

(A) 1 N HCl	48,0 ml	(B) 1 N HCl	48,0 ml
Tris	36,6 g	Tris	5,98 g
TEMED	0,23 ml	TEMED	0,46 ml
H ₂ O	auf 100,0 ml	H ₂ O	auf 100,0 ml
(C) Acrylamid	28,0 g	(D) Acrylamid	10,0 g
BIS	0,735 g	BIS	2,5 g
H ₂ O	auf 100,0 ml	H ₂ O	auf 100,0 ml
(E) Riboflavin	4 mg	(AP) Ammonpersulfat	0,14 g
H ₂ O	auf 100,0 ml	H ₂ O	auf 100 ml

Puffer: TRIS 6,0 g

Glykokoll 28,8 g

H₂O auf 1000 ml

5. Arbeitslösungen

1. Trenngel
1 Teil A, 2 Teile C, 3 Teile H_2O
4 Teile AP (pH 8,9)
2. Sammel- und
Frobengel
1 Teil B, 2 Teile D, 1 Teil E
4 Teile H_2O (pH 6,7)
3. Puffer
1 : 10 verd. Pufferstammlösung, schwach
angefärbt mit Bromphenol-Blau (pH 8,3).

VIII. Ergebnisse der kinetischen Messungen

1. K_m und k_{+2} der Hydrolyse von Up(c) in Abhängigkeit vom Puffer-system und pH-Wert (Abb. 14 - 18)

a) DMGS/NaOH, b) DMGS/Tris, c) Tris/HCl, d) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$

I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-4}\text{M})$				$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$			
	a	b	c	d	a	b	c	d
6,6	3,0	0,6			140	38		
7,0		1,9	1,2	1,2		54	42	11
7,1	6,1				137			
7,4		4,0	3,6	2,4		54	42	14
7,6	11,9				120			
7,8		7,2	11,1	5,6		30	26	15

2. Up(c) ($0,41 - 2,69 \cdot 10^{-4}\text{M}$) in NaAc I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-5}\text{M})$	$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^5 \text{sec}^{-1}\text{M}^{-1})$
3,7	0,55	10	18,2
4,1	0,74	17	23,0
4,6	1,35	25	18,5
5,0	1,78	27	15,2
5,5	1,54	17	11

3. Up(c) ($0,40 - 1,53 \cdot 10^{-3}\text{M}$) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-4}\text{M})$	$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^4 \text{sec}^{-1}\text{M}^{-1})$
4,0	0,41	16	39,0
4,7	1,00	37	37,0
5,4	1,53	62	42,8
6,1	2,32	110	47,4
6,6	3,00	140	46,7
7,1	6,10	137	22,5
7,6	11,90	120	10,1

4. N-Methyl-Up(c) ($0,56 - 3,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$) in DMGS/NaOH $I = 0,2$

pH	$K_m (10^{-4} \text{M})$	$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^4 \text{sec}^{-1} \text{M}^{-1})$
4,6	3,45	16,7	4,8
6,1	3,45	6,9	2,0

5. Cp(c) ($0,40 - 1,50 \cdot 10^{-3} \text{M}$) in DMGS/NaOH $I = 0,2$ 25°C

pH	$K_m (10^{-4} \text{M})$	$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^4 \text{sec}^{-1} \text{M}^{-1})$
4,0	0,19	10	52,5
4,7	0,92	33	35,8
5,4	1,01	27	26,8
6,1	0,99	36	36,4
6,6	1,24	53	42,7
7,1	2,97	47	15,8
7,6	4,58	30	6,1

6. ApA ($0,10 - 0,73 \cdot 10^{-4} \text{M}$) in DMGS/NaOH $I = 0,2$ 25°C

pH	$K_m (10^{-6} \text{M})$	$k_{+2} (\text{sec}^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^5 \text{sec}^{-1} \text{M}^{-1})$
3,7	10,1	31,3	31,0
4,2	4,6	22,2	48,0
4,6	4,3	21,7	51,0
5,2	4,7	11,9	28,9
5,6	4,3	11,0	26,0
6,1	3,6	7,1	19,5
6,6	3,3	4,1	12,1
7,1	8,0	3,5	4,4
7,6	22,0	1,5	0,7

7. ApG (0,13 - 0,67 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-6}M)$	$k_{+2} (sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^5 sec^{-1} M^{-1})$
3,7	6,0	10,5	17,5
4,2	5,0	9,1	18,2
4,6	2,7	8,0	29,6
5,2	2,1	8,2	39,0
5,6	4,3	9,5	22,1
6,1	9,0	14,0	15,5
6,6	8,1	12,7	15,7
7,1	5,4	11,3	20,9
7,6	3,1	9,8	31,8

8. ApC (0,14 - 0,91 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-5}M)$	$k_{+2} (sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^5 sec^{-1} M^{-1})$
3,7	0,7	16,7	23,8
4,2	1,3	21,7	16,7
4,6	2,4	26,0	10,8
5,2	3,6	24,8	6,9
5,6	3,0	22,2	7,4
6,1	1,3	10,5	8,1
6,6	1,2	5,3	4,8
7,1	1,7	5,8	3,4
7,6	2,1	3,8	1,8

9. ApU (0,19 - 0,73 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m (10^{-5}M)$	$k_{+2} (sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^5 sec^{-1} M^{-1})$
3,7	1,2	31	25,6
4,6	2,3	42	18,2
5,1	3,1	38	12,2
5,6	2,2	30	13,5
6,1	1,7	22	13,0
6,6	0,8	8	10,1
7,6	4,9	7	1,4

10. IpU (0,25 - 0,89 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-4}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
4,6	0,63	111	17,7
5,6	4,0	208	5,2
6,1	2,0	67	3,3

11. GpA (0,17 - 0,51 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-5}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
3,7	4,4	40	9,0
5,1	2,2	23	10,3
5,6	3,0	18	6,1
6,1	5,1	22	4,3
6,6	4,1	7,5	1,8
7,6	2,5	2,1	0,8

12. GpU (0,21 - 0,86 10^{-4} M) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-5}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
3,7	1,4	21	16,4
4,2	3,0	32	10,0
4,6	7,7	45	4,2
5,1	12,1	61	3,5
5,6	11,0	55	3,0
6,1	7,8	46	7,5
6,6	1,6	16	6,8
7,1	2,5	11	4,5
7,6	4,1	8	2,0

13. CpA (0,18 - 0,82 $10^{-4}M$) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-5}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
3,7	0,8	31	39
4,2	1,6	45	28
4,6	2,1	55	26
5,2	3,5	58	17
5,6	3,3	55	17
6,1	2,8	47	16
6,6	5,4	23	4,2
7,1	3,4	12	3,5
7,6	2,6	5	1,9

14. CpC (0,24 - 1,06 $10^{-4}M$) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-5}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
3,7	1,3	30	23
4,2	1,9	48	25
4,6	2,0	46	23
5,1	2,5	51	20
5,6	1,6	27	18
6,1	0,7	14	20
6,6	0,8	5,2	7
7,1	2,5	5,0	2
7,6	2,4	2,2	0,9

15. UpA (0,19 - 0,82 $10^{-4}M$) in DMGS/NaOH I = 0,2 25°C

pH	$K_m(10^{-5}M)$	$k_{+2}(sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m(10^5 sec^{-1}M^{-1})$
3,7	0,9	37	41
4,2	2,8	79	29
4,6	3,9	112	29
5,1	6,7	128	19
5,6	2,9	72	24
6,1	1,7	46	27
6,6	1,7	18	10,5
7,1	4,4	24	5,5
7,6	7,7	13	1,7

16. 3'-Up- -naphthylester ($0,29 - 4,8 \cdot 10^{-4}M$) in DMGS/NaOH
 $I = 0,2 \quad 25^{\circ}C$

pH	$K_m (10^{-4}M)$	$k_{+2} (sec^{-1})$	$k_{+2}/K_m (10^4 sec^{-1} M^{-1})$
4,6	1,0	93	93
6,1	2,6	128	49
7,1	0,5	12,3	25
7,6	1,1	12,3	11

Literaturverzeichnis

1. H.G. Gassen, H. Witzel
European J. Biochem. 1, 36 (1967)
2. H. Follmann, H.J. Wieker, H. Witzel
European J. Biochem. 1, 243 (1967)
3. H.J. Wieker, H. Witzel
European J. Biochem. 1, 251 (1967)
4. H. Witzel
Ann. Chem. 635, 182 (1960)
5. H. Witzel
Ann. Chem. 635, 191 (1960)
6. A. Kuninaka
J.Agr. Chem. Soc. (Japan), 28, 282 (1954)
7. A. Kuninaka
J.Agr. Chem. Soc. (Japan), 29, 797 (1955)
8. R. Saruno
Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 20, 57 (1956)
9. K. Sato, F. Egami
J. Biochem. (Tokyo), 44, 753 (1957)
10. F. Egami, K. Takahashi, T. Uchida
in: "Progress in Nucleic Acid Research", Vol 3, S. 59
1964
11. W.G. Rushizky, H.A. Sober
J. Biol. Chem. 238, 371 (1963)
12. K. Takahashi
J. Biol. Chem. 240, 4117 (1965)
13. T. Uchida, F. Egami
J. Biochem. 61, 44 (1967)
14. O. Pongs
Diplomarbeit Marburg 1967
15. O. Pongs, H. Witzel
Z. Physiol. Chem. 378, 1242 (1967)
16. T. Uchida, F. Egami
in: Procedures in Nucleic Acid Research", S. 3,
New York 1966

17. M. Dixon, E.C. Webb
"Enzymes", London 1958
18. H.O. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
19. T.E. Weichselbaum
J.Am.Clin. Pathol. 7, 40 (1946)
20. B.J. Davis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
21. G.F. Koerner, R.J. Sinsheimer
J. Biol. Chem. 228, 1039 (1957)
22. T. Uchida, F. Egami
Anal. Biochem. 17, 135 (1966)
23. W.G. Rushizky, H.A. Sober
J. Biol. Chem. 237, 834 (1962)
24. K. Takahashi
J. Biochem. 49, 1 (1961)
25. T. Uchida
J. Biochem. 60, 115 (1966)
26. L. Bonacker
Staatsexamensarbeit, Marburg 1965
27. R. Seitz
Staatsexamensarbeit, Marburg 1967
28. M. Naoi-Tada, K. Sato-Asano, F. Egami
J. Biochem. (Tokyo) 46, 757 (1959)
29. T. Uchida, F. Egami
J. Japan.Biochem.Soc. 34, 407 (1962)
30. J.T. Madison, R.W. Hobley
Biochem. Biophys. Research Commun. 18, 153 (1965)
31. C. Ukita, M. Irie
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 6, 445 (1958)
32. R.W. Bald
Diplomarbeit, Marburg 1968
33. H.G. Gassen
Dissertation, Marburg 1965
34. J.J. Fox, N. Yung, J. Davoll, G.B. Brown
J. Am. Chem. Soc. 78, 2117 (1956)

35. T. Nishimura, B. Shimizu, I. Iwai
Chem. Pharm. Bull 11, 1470 (1963)
36. E.R. Reist, L.G. Goodman
Biochem. 3, 15 (1964)
37. J. Davoll, B.A. Lowy
J. Am. Chem. Soc. 73, 1650 (1951)
38. G.M. Tener
J. Am. Chem. Soc. 83, 164 (1961)
39. M. Smith, D.H. Rammner, J.H. Goldberg, H.G. Khorana
J. Am. Chem. Soc. 84, 430 (1962)
40. H.G. Fletscher, R.K. Ness
J. Am. Chem. Soc. 76, 760 (1954)
41. A. Holy, K.H. Scheit
Chem. Ber. 99, 3778 (1966)
42. H. Witzel
Mechanismen Enzymatischer Reaktionen S. 123, Göttingen
1964
43. L. Michaelis, M.L. Menten,
Biochem. Z. 49, 333 (1913)
- 43 a. G.E. Briggs, J.B.S. Haldane
Biochem. J. 19, 338 (1925)
44. M. Dixon, E.C. Webb
"Enzymes", London 1964
45. H. Lineweaver, D. J. Burk
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
46. S. Sato, T. Uchida, F. Egami
Arch. Biochem. Biophys. 115, 48 (1966)
47. H.J. Wieker
Dissertation, Marburg 1966
48. P. Hamm
Diplomarbeit, Marburg 1967
49. K. Dimroth, H. Witzel
Ann. Chem. 620, 109 (1959)
50. Hohl
Diplomarbeit, in Vorbereitung
51. H. Witzel
in "Progress in Nucleic Acid Research", Vol. 2, S. 221
(1963)

52. K. Dimroth, H. Witzel
in "Die Hefen" S. 483, Nürnberg 1960
53. R. Lohrmann, H.G. Khorana
J. Am. Chem. Soc. 86, 4188 (1964)
54. R. Naylor, P.T. Gilham
Biochem. 5, 2722 (1966)
55. H.M. Kissman, C. Pidacks, B.R. Baker
J. Am. Chem. Soc. 77, 18 (1955)
56. F. Cramer, H. Seidel
Biochim. Biophys. Acta 72, 150 (1963)
57. M.A. Stevens, G.B. Brown
J. Am. Chem. Soc. 80, 2759 (1958)
58. G.H. Beaven, E.R. Holiday, E.A. Johnson
in Chargaff, Davidson: "The Nucleic Acids" Vol 1,
S. 493, New York (1955)
59. H.G. Gassen, H. Witzel
Biochim. Biophys. Acta 95, 244 (1965)
60. L. Birkofer, A. Ritter, H.P. Kühltau
Chem. Ber. 97, 934 (1964)
61. O. Pongs
Dissertation, in Vorbereitung

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Dr. H. Witzel,

danke ich für die Anleitung und wohlwollende
Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 3. Februar 1939 wurde ich als Sohn des Modellschlossers Ludwig Bonacker und seiner Ehefrau Maria-Elisabeth, geborene Velte, in Wallau/Lahn geboren.

Von 1946 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Wallau und danach die Lahntalschule in Biedenkopf, wo ich im März 1960 die Reifeprüfung bestand.

Seit dem Sommersemester 1960 studierte ich die Fächer Chemie, Biologie, Leibeserziehung und Pädagogik an der Universität Marburg. Das Staatsexamen für das Lehramt an Höheren Schulen bestand ich im Dezember 1965.

Seit dem 7. August 1964 bin ich mit der Sekretärin Inge Blank aus Marburg verheiratet.

Während der Staatsexamensarbeit und der Doktorarbeit, die unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. H. Witzel in der Zeit von Januar 1966 bis Mai 1968 entstand, beschäftigte ich mich mit biochemischen Problemen.

Meine akademischen Lehrer waren:

Becker, Brück, Cleffmann, Dimroth, Dorer, Drawert, Düker, Ebbinghaus, Froese, Golenhofen, Grabowsky, Hensel, Kessel, Kessler, Kirmse, Kuhn, Lübbers, Lüdtke, Mahr, Mattes, Matthias, Musso, Pfeil, Reich, Roeder, Rohen, Schnepf, Seelig, Seidel, von Stosch, Walcher, Winkler, Witzel.

